

Marta Lafuente Adiego

Estrategias para la detección de
compuestos organofosforados en
fase gas y líquida mediante
espectroscopía Raman-SERS

Director/es

MALLADA VIANA, REYES
PINA IRITIA, M^a PILAR

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE
COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN FASE
GAS Y LÍQUIDA MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA
RAMAN-SERS

Autor

Marta Lafuente Adiego

Director/es

MALLADA VIANA, REYES
PINA IRITIA, M^a PILAR

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2020



Universidad Zaragoza

“Estrategias para la detección de compuestos organofosforados en fase gas y líquida mediante Espectroscopía Raman – SERS”

“Detection strategies for organophosphorous compounds in gas and liquid phase based on Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS)”

This thesis dissertation is submitted to the Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies at the University of Zaragoza (Spain) in fulfilment of the requirements needed for obtaining the degree of Doctor

Marta Lafuente Adiego

Zaragoza, 2020



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

INMA
INSTITUTO DE NANOCIENCIA
Y MATERIALES DE ARAGÓN





Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

Dr. María Pilar Pina Iritia and **Dr. Reyes Mallada Viana**, both professors at the University of Zaragoza in the Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies and members of the Institute of Nanoscience and Materials of Aragon.

Inform that,

The Doctoral thesis entitled:

“Detection strategies for organophosphorous compounds in gas and liquid phase based on Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS)”

has been written by Ms. **Marta Lafuente Adiego** under our supervision in the Department of Chemical and Environmental Engineering and in the Institute of Nanoscience and Materials of Aragon

AND

We authorize and approve the presentation of this dissertation.

And for the record, we sign this document in Zaragoza on 8 September 2020.

Fdo. María Pilar Pina Iritia

Fdo. Reyes Mallada Viana



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

Las doctoras Dra. **María Pilar Pina Iritia** y Dra. **Reyes Mallada Viana**, ambas Profesoras Titulares pertenecientes al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza y miembros del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón.

INFORMAN

que la presente memoria titulada:

“Estrategias para la detección de compuestos organofosforados en fase gas y líquida mediante Espectroscopía Raman - SERS”

se ha desarrollado y elaborado bajo su supervisión por Dña. **Marta Lafuente Adiego**, en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente y en el Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón, y, en consecuencia, autorizamos su presentación.

Y para que así conste, firmamos este certificado en Zaragoza a 8 de septiembre de 2020.

Fdo. María Pilar Pina Iritia

Fdo. Reyes Mallada Viana

*La vida es como montar en bicicleta,
para conservar el equilibrio hay que seguir avanzando.*

Albert Einstein

A mi familia

Agradecimientos / Acknowledgements

Es de bien nacido ser agradecido, como suele decir mi abuela, por lo que me gustaría dedicar este primer apartado de la tesis a todas las personas que me han acompañado y ayudado a lo largo de esta etapa que ahora llega a su fin.

El primer reconocimiento no puede ser sino para Pili y Reyes, Reyes y Pili, tanto monta, monta tanto. Fueron ellas quienes me abrieron, hace ya seis años, las puertas del mundo de la investigación, mostrando desde el inicio una confianza plena en mis posibilidades que siempre les agradeceré. Las dificultades, dudas y vacilaciones surgidas en el camino las fui superando gracias a sus sabios consejos y su esforzado ejemplo. Sin ellas, claro es, no podría haber alcanzado los objetivos propuestos al comienzo de este trabajo, de ahí mi gratitud profunda y sincera.

También quisiera acordarme de todos los miembros del NFP, profesores y doctores, por aportarme nuevas miradas en los momentos en los que me encontraba ante callejones, en apariencia, sin salida. Sin ánimo de ser exhaustiva, quisiera mencionar a algunas personas que han facilitado enormemente mi trabajo diario y cuyo papel ha resultado esencial para sacarlo adelante. Nuria, por su paciencia y apoyo frente al Raman; Miguel Urbiz, que me ha escuchado siempre, incluso en mis momentos más bajos; Laura Usón, la mejor compañera, de mesa y de café; Gracia, por su sentido del humor y las risas compartidas; e Isma, el jefe que se convirtió en amigo pese a que la peonza de becarios indicara lo contrario. Tampoco podría olvidarme de los técnicos del LMA, siempre dispuestos a ayudarme ante el más mínimo problema.

Este apartado no estaría completo si no me refiriera a aquellas personas que me acogieron en Holanda, donde viví una experiencia breve pero fantástica. Mi agradecimiento, pues, al Dr. Niels Tas, Ing. Erwin Berenschot y Dr. Roald Tiggelaar. *I would like to thank Dr. Niels Tas, Ing. Erwin Berenschot and Dr. Roald Tiggelaar for giving me the opportunity to join in their lab at University of Twente, helping me to expand my knowledge, for their permanent support and for thier good mood.* Tampoco me olvido de Pablo, el mejor compañero y mentor que pude tener durante mi estancia.

Pero esta etapa de mi vida será inolvidable por mis compañeros del INA, con los que he compartido mi alegría y mi apatía, casi una segunda familia. Ha sido un placer contar con ellos en mis horas de trabajo, pero sobre todo en las de desconexión, con nuestros

café, comidas y fiestas varias. Mención especial para mis *amiguis*: Roberta, mi italiana especial; Isa, compañera de tantos INAniversarios; Cris, que tanto me ha hecho reír; Sara, un ejemplo de perseverancia; y, Bea, por su felicidad contagiosa. También me acuerdo de María y su entusiasmo, de Alberto y Martín, que dejaron un gran vacío con su marcha, de Eduardo, el *becario* ideal, y de Arturo, Ainhoa y Cristóbal, tres soplos de aire fresco. Por último, unas líneas para *mis chicos*: Diego, compañero tanto de tristezas como de alegrías; y Fernando, un gran amigo, con recuerdos memorables, aunque en nuestro caso lo mejor siempre esté por llegar.

A mis amigos del *mundo exterior* también les debo muchísimo por permitirme desconectar del trabajo y de la tesis en la mejor de las compañías. Gracias a las *Señoras*, creadoras de momentos únicos en viajes y noches interminables; gracias a mis amigas de la Uni, quienes entienden mejor que nadie lo que ha supuesto este esfuerzo; y gracias, en fin, a mis amigos de Rueda, mi casa y mi lugar de desconexión en el mundo.

Por último, y precisamente por ello, he reservado estas líneas finales para agradecer el apoyo constante de las personas más importantes de mi vida. Gracias a mis padres, que me lo han dado todo, en especial el ejemplo del esfuerzo y sus valores; a mis hermanos, Pilar y Pepe, para los que una frase nunca hará justicia porque, simplemente, son la base de mi vida; a mi yaya Pilar, fuente inagotable de refranes y compañía; gracias también a todos y cada uno de mis tíos, tías, primos y primas; a mi familia riojana, que me aceptó como a una más; y a Eugenio, para quien *menos es más*, rojo solo de leerse, y el mejor compañero de vida.

Summary and Thesis Outline

Resumen y Esquema de tesis

SUMMARY AND THESIS OUTLINE

The present work has been performed in the Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies at the University of Zaragoza (Spain), within the Nanostructured Films and Particles (NFP) group. The NFP is a member of the Institute of Nanoscience and Materials of Aragon (INMA). This research has been carried out over a period of 4-year, 2016-2020, under the supervision of Dr. María Pilar Pina Irtia and Dr. Reyes Mallada Viana and thanks to financial support of two National projects: “*Microsystems based on nanostructured materials for explosive and chemical warfare agents detection by selective sorption and surface plasmon*” (Ref. CTQ2013-49068-C2-1-R) and “*Advanced sorption, SERS detection and catalysis for chemical warfare threats*” (Ref. CTQ2016-79419-R). Finite-Difference Time-Domain, FDTD, simulation studies and nanofabrication in clean room have been performed in the MCs group lead by Prof. Hans Gardeniers in the MESA+ Institute at University of Twente, The Netherlands, during a predoctoral secondment supported by above mentioned projects, Fundación INA and Fundación CAI (ref. CB 6/18).

In this PhD, sensing platforms based on SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) were developed to detect and identify organophosphorous compounds in liquid and gas phase. These compounds are used as chemical weapons and pesticides, respectively. In this research different plasmonic nanoparticles and their deposition onto solid supports, together with ordered nano and microstructures with plasmonic properties have been studied and characterized. Different strategies have been tested to improve the affinity between analytes and metallic surface. The detection capabilities of the sensing platforms have been characterized using dimethyl methylphosphonate, DMMP, as analyte because it is considered as simulant of Sarin gas and all the G family of neurotoxic compounds, and paraoxon-methyl as active metabolite of the pesticide Parathion. The developed sensing platforms have been evaluated in terms of sensibility, selectivity, response time, stability, and portability.

FDTD simulations were carried out to understand SERS effect as fundamental phenomenon and to interpret and to predict experimental results obtained for the different SERS substrates.

This thesis is structured in nine chapters for the sake of an easy understanding:

- Chapter I provides an introduction on the need for detection of organophosphorous compounds in liquid and gas phase, the fundamentals of Raman Spectroscopy and SERS, and the different approaches for SERS substrate fabrication. Moreover, some fundamental information about FDTD is explained. Finally, a review of the recent literature and the state of the art about alternative strategies for detecting these compounds is described.
- Chapter II describes the Raman-SERS methodology developed and followed for the SERS substrates characterization, as well as the spectral fingerprint and band assignation of the different molecules studied in this work. The experimental set-up designed for the generation of vapours with tuneable concentration is also explained. The description of equipments and characterization technics are included in the *Appendix I*.
- Chapter III studies the plasmonic properties of silver nanoplates deposited onto three different solid supports: a wafer of SiO₂/Si, a stainless-steel mesh and graphite film. The best substrate is investigated for gas phase detection of DMMP through a direct interaction between the molecule and the plasmonic metal. Finally, this interaction is analysed by Density Functional Theory (DFT).
- Chapter IV is composed of two parts providing information about the synthesis and deposition methodology and characterization of two SERS platforms based on gold nanoparticles and electrostatic interaction as affinity agent: 1) gold nanoparticles coated with citrate ions for gas phase detection of DMMP; 2) in-situ photodeposition of gold nanoparticles coated with polyoxometalates (POMs) for continuous monitoring of pesticides in liquid phase. In both cases, the amplification of the Raman signal, selectivity, sensibility, recyclability, stability, and response time is evaluated.
- Chapter V studied SERS platforms based on the combination of plasmonic nanoparticles and sorbent materials, core-shell nanoparticles. It is divided in two systems for the detection of DMMP in gas phase: 1) mesoporous silica coated with gold nanoparticles deposited inside microfluidic silicon chips designed ad-hoc. 2) Gold-Silver nanorods coated with single ZIF8 crystals for the detection of nerve and tear agent simulants, diluted in environmental air to approach real conditions. The sorption and plasmonic properties and detection capabilities are evaluated in both systems.

- Chapter VI studies through FDTD simulations the enhanced electric field and experimental results the plasmonic properties of ordered and uniform gold nanostructures fabricated using top-down approaches.
- Chapter VII evaluates plasmonic properties of silicon micropiramids coated with a silver film, as well as the origin of their extraordinary amplification of the SERS signal, explained by FDTD simulations. It is divided in two parts depending on the final application: 1) Generation G0 and G1 of micropiramids for detecting pesticides; and 2) Fractal structures of generations G1 and G3 coated with a silver film and gold nanoparticles for detecting nerve agents.
- Chapter VIII presents a comparative summary of the SERS platforms developed in previous chapters for sensing nerve agents in gas phase and pesticides in liquid phase. Additionally, the platforms are compared with SERS sensor from the literature. Finally, they are compared with the maximum acute exposure values established by the United State Environmental Protection Agency (EPA) and European Environmental Agency (EEA).
- Finally, Chapter IX includes the general conclusions of this PhD dissertation.

RESUMEN Y ESQUEMA DE TESIS

El presente trabajo se ha desarrollado en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza (España), dentro del grupo de Películas y Partículas Nanoporosas (NFP), miembro del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA). La investigación se ha realizado durante cuatro años, 2016-2020, bajo la codirección de la Dra. María Pilar Pina Irítia y la Dra. Reyes Mallada Viana y ha estado financiada por los proyectos Nacionales: “*Microsistemas basados en nanoestructuras con propiedades específicas de adsorción y plasmón superficial para detección de explosivos ocultos y agentes*” (Ref. CTQ2013-49068-C2-1-R) y “*Tecnologías avanzadas de adsorción, detección SERS y catálisis para guerra química*” (Ref. CTQ2016-79419-R). Los estudios de simulación basados en Diferencias Finitas en el Dominio del Tiempo, FDTD, y la fabricación de nanoestructuras se han desarrollado en el MESA+ Institute de la Universidad de Twente, Países Bajos, durante una estancia de investigación predoctoral de tres meses cofinanciada por los proyectos anteriormente mencionados, la Fundación INA y el programa Ibercaja-CAI de estancias de investigación (Ref. CB 6/18).

En esta tesis doctoral se han desarrollado plataformas sensibles basadas en la tecnología SERS (Espectroscopía Raman Intensificada por Superficies) para la detección e identificación inequívoca de compuestos organofosforados en fase gas y líquida. Estos compuestos se utilizan como agentes de guerra química y pesticidas, respectivamente. En el desarrollo de este trabajo se han estudiado y caracterizado diferentes nanopartículas plasmónicas y su depósito sobre un soporte sólido, nano y microestructuras con propiedades plasmónicas, así como diferentes estrategias de anclaje del analito a la superficie metálica. Se han caracterizado las capacidades de detección de las plataformas sensibles considerando el metilfosfonato de dimetilo, DMMP, como molécula diana al ser un simulante del gas Sarín y de toda la serie G de agentes neurotóxicos y el paraoxon-metil por ser el metabolito activo del potente pesticida paratión. Estas plataformas sensibles se han evaluado en términos de sensibilidad, selectividad, tiempo de repuesta, estabilidad y posibilidad de detección en condiciones de campo.

Además, se han llevado a cabo simulaciones basadas en FDTD para entender la amplificación local del campo eléctrico sobre la superficie metálica y con ello conseguir predecir el efecto SERS.

La tesis se ha articulado en torno a nueve capítulos con el objetivo de facilitar la lectura y el análisis del trabajo. Son los que siguen:

- En el capítulo I se introduce la necesidad de detectar compuestos organofosforados en fase gas y líquida, los fundamentos básicos de la espectroscopía Raman y SERS, y las diferentes opciones de fabricación de sustratos SERS. Además, se explican los conceptos fundamentales acerca de la simulación de campos eléctricos basada en el método computacional FDTD. Finalmente, se proporciona una breve revisión de literatura reciente y estado del arte sobre estrategias alternativas para la detección de estos compuestos.
- En el capítulo II se describe la metodología experimental Raman-SERS para la caracterización de los sustratos SERS desarrollados. Se representa la huella dactilar y la asignación de bandas de las moléculas patrón, DMMP y paraoxon-metil, utilizadas en esta tesis. También se describen los sistemas de generación de vapores y sistemas de detección SERS en fase gas. La descripción de los equipos y técnicas de caracterización se incluyen en el *Anexo I*.
- El capítulo III estudia las propiedades plasmónicas de nanotriángulos de plata depositados sobre tres soportes sólidos diferentes: una oblea de SiO₂, una malla de acero y una plancha de grafito. La mejor plataforma se evalúa para la detección de DMMP en fase gas aprovechando la interacción directa entre el analito y el metal. Finalmente, se analiza la interacción DMMP-Ag mediante la Teoría del Funcional de Densidad (DFT).
- El capítulo IV está dividido en dos partes que proporcionan información sobre la síntesis, depósito y caracterización de dos sistemas SERS basados en nanopartículas de oro y un anclaje del analito electroestático: 1) Nanopartículas oro recubiertas de citrato para la detección de agentes neurotóxicos en fase gas; 2) Nanopartículas oro sintetizadas y depositadas *in-situ* recubiertas de Polioxometalatos (POMs) para la monitorización en continuo de pesticidas en fase líquida. En ambos casos se han llevado a cabo estudios de amplificación de la señal, selectividad, sensibilidad, estabilidad, reusabilidad y tiempo de respuesta.
- El capítulo V estudia plataformas SERS basadas en la combinación de nanopartículas plasmónicas con materiales adsorbentes, nanopartículas *core-shell*. Se divide en dos partes focalizadas en la detección de agentes neurotóxicos en fase gas: 1) Sílice mesoporosa recubierta de nanopartículas de oro depositadas en chips

de microfluídica de silicio diseñados *ad hoc*. 2) Nanorods de oro y plata recubiertos con cristales microporosos de ZIF8 para la detección de simulantes de gases neurotóxicos y lacrimógenos en fase gas, se utiliza como diluyente aire del ambiente para aproximarse a condiciones reales. En ambos sistemas se estudian las propiedades de adsorción de los materiales, sus propiedades plasmónicas y su capacidad para detectar al analito.

- El capítulo VI estudia de manera teórica las propiedades plasmónicas de nanoestructuras de oro ordenadas y fabricadas mediante tecnología *top-down*. Lo hace a través del método FDTD de amplificación del campo eléctrico y lo compara con los resultados experimentales.
- El capítulo VII evalúa las propiedades plasmónicas de micropirámides de silicio recubiertas de plata, así como el origen de su extraordinaria amplificación de la señal Raman, mediante simulaciones FDTD. El capítulo se divide en dos dependiendo de la aplicación final de la plataforma: 1) Micropirámides de generación G0 y G1 para la detección de pesticidas en fase líquida; y 2) Estructuras fractales de generación G1 y G3 recubiertas de plata y oro para la detección de agentes neurotóxicos en fase gas.
- El capítulo VIII presenta un resumen comparativo de las plataformas SERS desarrolladas en los capítulos anteriores para la detección de agentes neurotóxicos en fase gas y pesticidas en fase líquida. Asimismo, las plataformas se comparan con otros sensores SERS reportados en literatura, y finalmente, con los niveles de exposición máxima establecidos por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA) y la Agencia Europea del Medio Ambiente (EEA).
- El capítulo IX contiene las conclusiones generales de esta tesis.

ÍNDICE

Agradecimientos / Acknowledgements	i
SUMMARY AND THESIS OUTLINE	v
RESUMEN Y ESQUEMA DE TESIS	viii
Índice	xi
Listado de símbolos y acrónimos.....	xv
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Compuestos Organofosforados tóxicos	5
1.1.1 Agentes neurotóxicos	5
1.1.2 Pesticidas organofosforados	7
1.2 Espectroscopías vibracionales	9
1.2.1 Efecto Raman	10
1.3 Espectroscopía Raman Intensificada por Superficies (SERS)	13
1.3.1 Propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas	14
1.3.2 Mecanismos de intensificación SERS	17
1.4 Sustratos SERS	22
1.4.1 Sustratos coloidales: <i>Bottom-up</i>	23
1.4.2 Sustratos nanoestructurados: <i>Top-down</i>	29
1.4.3 Sustratos SERS comerciales.....	32
1.5 Afinidad del analito con la superficie plasmónica	32
1.6 Simulación del campo electromagnético	35
1.7 Equipos Raman portables	38
1.8 Tecnologías para la detección de compuestos organofosforados.....	38
1.8.1 Detección de agentes neurotóxicos	38
1.8.2 Detección de pesticidas	40
1.9 Objetivos	42
2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL RAMAN-SERS	45
2.1 Instrumentación Raman.....	45
2.1.1 Equipo Raman de sobremesa	45
2.1.2 Equipo Raman portable	49
2.2 Factor de Aumento Analítico (AEF)	50
2.3 Detección de agentes neurotóxicos en fase gas	52
2.3.1 Analitos de detección, toxicidad y medidas de seguridad	52
2.3.2 Caracterización de la huella espectral de DMMP y CEES en fase líquida	54

2.3.3	Celda de gases	56
2.3.4	Generación de vapores de DMMP, simulante del gas Sarín	57
2.3.5	Generación de vapores de CEES, simulante del gas mostaza	61
2.4	Detección de pesticidas en fase líquida	63
2.4.1	Detección en estático	65
2.4.2	Detección en continuo	66
3	NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS	69
3.1	Introducción	69
3.2	Procedimiento experimental	70
3.2.1	Materiales	70
3.2.2	Síntesis de nanotriángulos de plata (Ag nPlates)	71
3.2.3	Preparación del sustrato SERS	71
3.2.4	Cálculos computacionales DFT.....	72
3.3	Resultados.....	73
3.3.1	Caracterización de los sustratos SERS	73
3.3.2	Espectroscopía Raman de los sustratos SERS con R6G	76
3.3.3	Detección de DMMP en sustratos SERS Ag nPlates@grafito.....	78
3.4	Conclusiones	83
4	NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN FASE GAS Y LIQUIDA	87
4.1	Introducción	87
4.2	Nanopartículas oro recubiertas de citrato para la detección de agentes neurotóxicos en fase gas	88
4.2.1	Procedimiento experimental.....	88
4.2.2	Resultados	90
4.3	Nanopartículas oro recubiertas de Polioxometalatos (POMs) para la detección de pesticidas en fase líquida	103
4.3.1	Procedimiento experimental.....	104
4.3.2	Resultados	108
4.4	Conclusiones	121
5	NANOPARTÍCULAS CORE-SHELL PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS	125
5.1	Introducción	125
5.1.1	Sílice mesoporosa MCM-48.....	125
5.1.2	Materiales metal-orgánico estructurados.....	126

5.2	Sílice mesoporosa recubierta de nanopartículas de oro para la detección de agentes neurotóxicos en fase gas usando chips de microfluídica.....	128
5.2.1	Procedimiento experimental.....	128
5.2.2	Resultados	134
5.3	Nanopartículas <i>Core-Shell</i> Au@Ag@ZIF8 para la detección de gases neurotóxicos y lacrimógenos en fase gas.....	152
5.3.1	Procedimiento experimental.....	152
5.3.2	Resultados	155
5.4	Conclusiones	169
6	SUSTRATOS SERS BASADOS EN NANOESTRUCTURAS DE ORO PREPARADAS POR METODOLOGÍA <i>TOP-DOWN</i>.....	173
6.1	Introducción	173
6.2	Procedimiento experimental	174
6.2.1	Materiales	174
6.2.2	Fabricación de las nanoestructuras de oro.....	174
6.2.3	Simulación FDTD	178
6.3	Resultados.....	178
6.3.1	Caracterización de la morfología de las nanoestructuras	178
6.3.2	Caracterización de las propiedades plasmónicas: simulación FDTD y AEF	185
6.4	Conclusiones	194
7	MICROESTRUCTURAS 3D PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN FASE GAS Y LIQUIDA	197
7.1	Introducción	197
7.2	Fabricación de microestructuras SERS.....	198
7.2.1	Fabricación de microestructuras 3D periódicas tipo fractal	198
7.2.2	Evaporación de capas finas de plata.....	199
7.3	Micropirámides G0 y G1 Recubiertas de plata para la detección de pesticidas en fase líquida	201
7.3.1	Procedimiento experimental.....	201
7.3.2	Resultados	203
7.4	Estructuras fractales 3D recubiertas de plata y oro para la detección de agentes neurotóxicos en fase gas.....	213
7.4.1	Procedimiento experimental.....	213
7.4.2	Resultados	215
7.5	Conclusiones	221

8 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS PLATAFORMAS SERS DESARROLLADAS PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS.....	227
8.1 Detección de Agentes neurotóxicos en fase gas	227
8.1.1 Comparación entre los diferentes sustratos SERS desarrollados	227
8.1.2 Estado del arte y comparación de sustratos SERS para detección en fase gas..	230
8.2 Detección de pesticidas en fase líquida	234
8.2.1 Comparación entre los diferentes sustratos SERS desarrollados	234
8.2.2 Estado del arte y comparación de sustratos SERS para detección en fase líquida	237
9 CONCLUSIONES GENERALES	243
GENERAL CONCLUSIONS	245
Anexo I. Equipos y técnicas de caracterización	249
Anexo II. Protocolo de medida del Factor de Aumento Analítico (AEF).....	257
Anexo III. Planos de la celda de gases	261
Anexo IV. Métodos de deposición o recubrimiento.....	264
Anexo V. Concentración de DMMP expresada como presión relativa.....	270
Anexo VI. Número de moléculas de paraoxon-metil en el área escaneada de los sustratos SERS con micropirámides G1	271
BIBLIOGRAFÍA	277
Listado de Publicaciones	311
Comunicación a congresos.....	313

Listado de símbolos y acrónimos

4-NBT: 4-nitrotiofenol

AEF: Factor de Aumento Analítico

AEGLs: *Acute Exposure Guideline Levels*

AFM: microscopía de fuerza atómica

Ag nPlates@grafito: nanotriángulos de plata depositados sobre grafito

Au@Ag@ZIF8: rods concéntricos de Au y Ag encapsulados en cristales de ZIF8

Au@MCM: nanopartículas de sílice mesoporosa recubiertas de nanopartículas de oro

Au@Stöber: nanopartículas de sílice densa recubiertas de nanopartículas de oro

AuNP@citrato: nanopartículas de oro recubiertas de iones citrato

AuNP@PMo: nanopartículas de oro estabilizadas con el polioxometalato de PMo

AuNP@PW: nanopartículas de oro estabilizadas con el polioxometalato de PW

CEES: 2-cloroetilsulfuro

DFT: Teoría del Funcional de la Densidad

DMMP: Metilfosfonato de dimetilo

DTL: Displacement Talbot Lithography

\vec{E} : campo eléctrico

EBL: litografía por haz de electrones

EM: electromagnético

EPA: Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos

EPP: *Edge Plasmon Polaritons*

ERNICIP: *European Reference Network for Critical Infrastructure Protection*

FDTD: Diferencias Finitas en el Dominio del Tiempo (*Finite-Difference Time-Domain*)

Gi: micropirámide de generación i, siendo i = 1^a, 2^o o 3^a

HOMO: *Highest Occupied Molecular Orbital*

IBE: grabado por haz de iones

IR: infrarrojo

I_{Raman}: intensidad Raman

I_{SERS}: intensidad SERS

KOH: hidróxido de potasio

LbL: *Layer-by-Layer*

LOCOS: Local Oxidation of Silicon

LOD: Límite de detección

LSP: Plasmones de superficie localizados

LUMO: *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

MCM48: sílice mesoporosa MCM48

ME: Mecanismo electromagnético

MOFs: *Metal-Organic Frameworks*

NIR: infrarrojo cercano

NP: nanopartícula

NRBQ: Nuclear, Radiológico, Biológico y Químico

PDDA: cloruro de poli(alildimetilamonio)

PDMS: polidimetilsiloxano

PML: *Perfect Matched Layer*

POM: polioxometalato

ppb: partes-por-billón

ppm: partes-por-millón

R6G: rodamina 6G

RIE: grabado reactivo iónico

RSD: desviación estándar relativa

RSS: dispersión Raman resonante

SEM: microscopia electrónica de barrido

SERRS: Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering

SERS: Espectroscopía Raman Intensificada por Superficies (*Surface Enhanced Raman Scattering*)

SP: plasmón de superficie

SPP: polaritones de plasmones de superficie (*surface plasmon polaritons*)

SPR: plasmón de resonancia de superficie

t_{50%}: tiempo en alcanzar el 50% de la señal

TC: mecanismo de transferencia de carga o mecanismo químico

TEM: microscopia electrónica de transmisión

TMAH: hidróxido de tetrametilamonio

UV: ultravioleta

UV-Vis: ultravioleta-Visible

ZIF8: *Zeolite imidazolate frameworks*

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

Resumen

En este capítulo se detallan las características que un sensor debe cumplir para poder ser implementado en la detección de compuestos químicos en fase gas y líquida y que actuarán de hilo conductor en el resto de los capítulos. Se realiza un análisis general de la tecnología Raman-SERS: origen, metodologías de fabricación de sustratos SERS y estrategias para mejorar la afinidad entre este y el analito. Los beneficios de realizar cálculos teóricos de predicción del efecto SERS también son discutidos. Finalmente, se describen las tecnologías alternativas de detección.

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos 200 años la evolución de la química y de los procesos químicos ha introducido en nuestro entorno una gran cantidad de productos químicos y biológicos tóxicos. Estos compuestos están dispersos en suelos, agua o aire produciendo efectos nocivos para la salud y el medioambiente. Además, desde la Primera Guerra Mundial, esta toxicidad ha sido utilizada para diseñar armas químicas a gran escala como el gas mostaza o el fosgeno [1].

Los compuestos organofosforados fueron desarrollados durante la Segunda Guerra Mundial con la finalidad militar de ser agentes neurotóxicos. Más recientemente, estos compuestos han sido utilizados como armas químicas en la guerra de Siria en 2013 y 2017 [2] y en ataques terroristas, como en Japón en 1995 [3]. En Europa, el miedo a un ataque terrorista es la cuarta preocupación de los ciudadanos, por detrás del cambio climático, el desafío de la inmigración y la situación económica, según el Eurobarómetro de 2019 [4], aunque nunca se ha producido un ataque de estas características. Asimismo, proteger la seguridad ciudadana frente a un ataque NRBQ (Nuclear, Radiológico, Biológico y Químico) es la segunda prioridad marcada por la Agenda Europea de Seguridad en su Plan de Acción [5].

Tras la guerra, estos compuestos comenzaron a utilizarse como pesticidas en agricultura, su aplicación más extendida en la actualidad, pero un uso abusivo de ellos puede acabar contaminando el ecosistema. El agua es la principal puerta de acceso a la cadena alimenticia y su contaminación puede producir un riesgo para la salud animal y humana. De acuerdo con los indicadores Agro-alimentarios de la Unión Europea del 2013 [6], último año con valores reportados, alrededor del 7% del agua potable procedente de manantiales y el 5% de la de los ríos exceden para más de un pesticida los niveles máximos permitidos.

En consecuencia, la detección e identificación inequívoca de compuestos tóxicos organofosforados en aire y agua es crucial para garantizar la seguridad de la sociedad civil y militar y un ecosistema sostenible, en el mundo actual. Para ello, los sensores desarrollados deberán ser selectivos, sensibles, fiables y robustos evitando los falsos positivos o falsos negativos, estables y tener tiempos de repuesta cortos, además de ser portables.

La espectroscopía Raman es una técnica analítica que identifica la huella dactilar de la molécula proporcionando un análisis cualitativo y cuantitativo de manera no destructiva [7]. La amplificación de la señal Raman, de hasta varios ordenes de magnitud, que originan las nanoestructuras metálicas ha permitido el desarrollo de la Espectroscopía Raman Intensificada por Superficies (SERS, de su siglas en inglés *Surface Enhanced Raman Scattering*) la cual proporciona una alta sensibilidad de detección, incluso a nivel de moléculas aisladas [8,9], Figura 1.1.

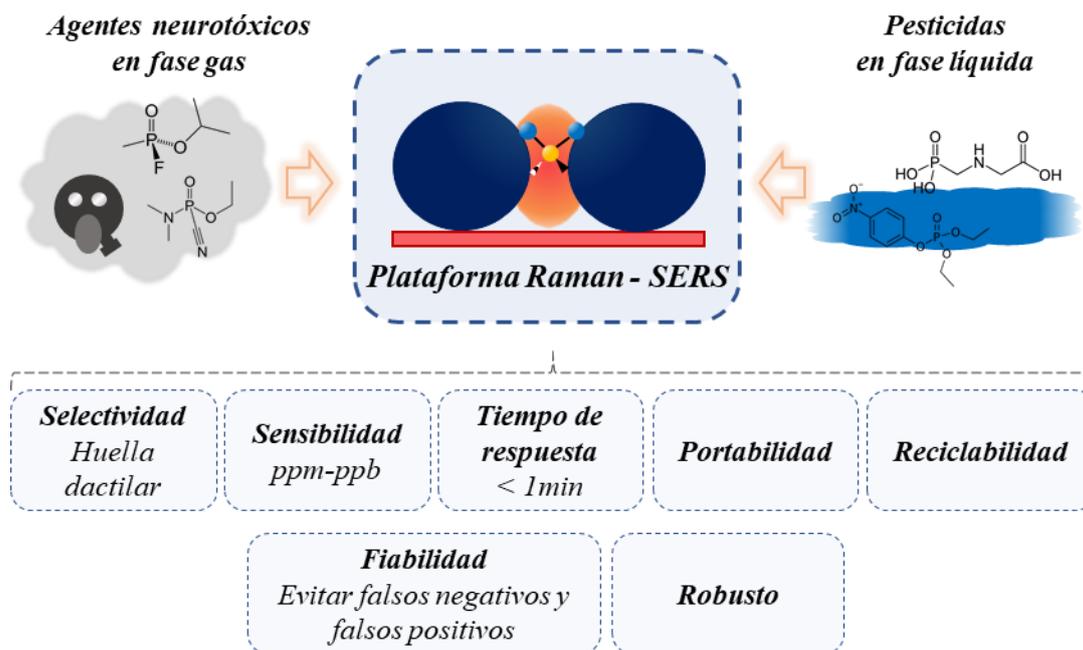


Figura 1.1 Sensores SERS para la detección de compuestos organofosforados en fase gas, agentes nerviosos, y en fase líquida, pesticidas, junto con las propiedades que debe cumplir este sensor para ser utilizado en dichas aplicaciones.

Por lo tanto, esta tecnología cumple con la mayoría de los requisitos en la detección de compuestos organofosforados (Figura 1.1): la selectividad y fiabilidad la ofrece la monitorización de la huella dactilar, la sensibilidad la resonancia del plasmón superficial, el tiempo de repuesta depende de la adsorción del analito en la superficie metálica, así como, la reciclabilidad del sensor. La portabilidad es uno de los parámetros más importantes, especialmente en la detección de agentes neurotóxicos. Según IFAFRI (del inglés, *International Forum to Advance First Responder Innovation*), las unidades de intervención en caso de amenaza NRBQ, necesitan de herramientas y equipos tecnológicamente avanzados que sean asequibles e innovadores para identificar, detectar y analizar rápidamente amenazas y peligros en condiciones de campo [10]. La Figura 1.2 recrea la actuación de una unidad NRBQ en un ataque en los túneles del metro.

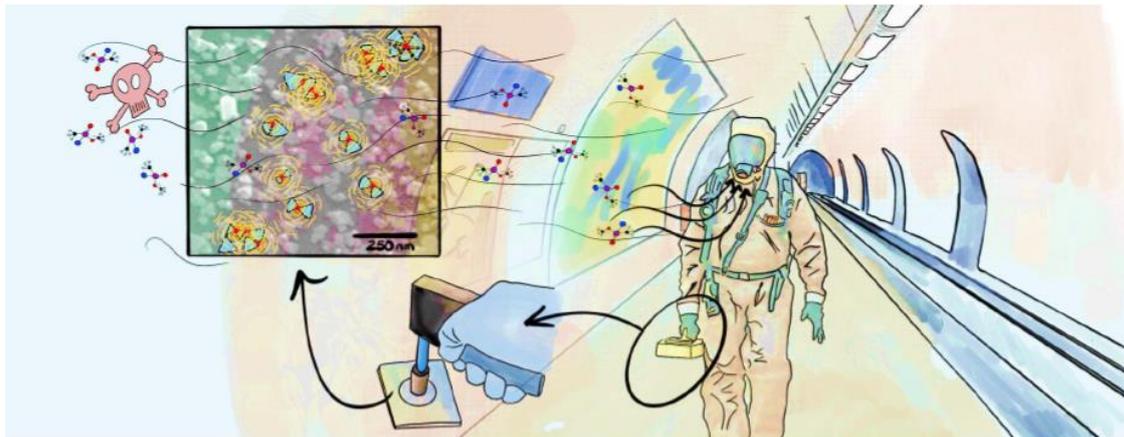


Figura 1.2 Recreación de la actuación de la unidad NRBQ en un ataque con gases tóxicos en el túnel del metro. Transporta un equipo Raman portátil y un sensor SERS basado en nanopartículas de plata. Adaptada de nuestra publicación [11].

1.1 COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS TÓXICOS

Los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y fosfónico capaces de inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, y los efectos son el resultados del exceso de acetilcolina, un neurotransmisor relacionado con el sistema nervioso central, lo cual origina espasmos musculares que pueden causar la muerte.

1.1.1 Agentes neurotóxicos

Según la Convención por las Armas Químicas (CWC, *Chemical Weapons Convection*), un agente químico de guerra (*Chemical Warfare Agent, CWA*) es toda sustancia química que, por su acción química sobre los procesos vitales, pueda causar la muerte, la incapacidad temporal o lesiones permanentes a seres humanos o animales [12]. Los CWAs se clasifican según sus efectos en el cuerpo humano en los grupos generales que aparecen resumidos en la Tabla 1.1.

Los compuestos organofosforados forman parte de los agentes nerviosos o neurotóxicos. Estos son las armas más tóxicas de todas las que se conocen, cientos de miles de veces más letales que los vesicantes, pulmonares o venenosos que afectan a la sangre. Por ejemplo, la toxicidad del sarín es de 25 a 50 veces superior a la del cianuro de hidrógeno.

Tabla 1.1 Clasificación de las armas químicas (CWA) según sus efectos en el cuerpo humano, de más tóxicos a menos.

Clase de arma química	Ejemplos	Síntomas	Tiempo de acción
Agentes nerviosos o agentes neurotóxicos	Gas Sarín, Tabún, Somán y VX	Dificultad para respirar, sudoración, convulsiones y muerte	Vapores: de segundos a minutos Piel: de 2 a 18 h.
Agentes sanguíneos	Cianuro de hidrógeno	Respiración rápida, convulsiones y muerte.	Minutos
Agentes pulmonares (asfixiantes)	Fosgeno, cloro	Dificulta la respiración, efecto lacrimógeno, asfixia y muerte	De minutos a horas
Agentes vesicantes (causantes de ampollas)	Gas mostaza, Lewisita	Quemazón en los ojos y piel	Vapores: de 4 a 6 horas, los ojos y los pulmones quedan afectados antes. Piel: de 2 a 48 h.
Agentes lacrimógenos	Gas pimienta	Fuerte irritación de los ojos	Inmediato
Agentes discapacitantes o paralizantes)	Bencilato de 3-quinuclidinilo (BZ)	Confusión, fabulación no voluntaria y alucinaciones	Vapores: 30 min a 3h Piel: hasta 36 h después

Los agentes neurotóxicos se clasifican en serie G: sarín, GB; tabún, GA; y somán, GD, y serie V: VX [13]. La Tabla 1.2 nos muestra la volatilidad y toxicidad de los principales componentes de la línea de agentes nerviosos G y V. El VX es el más letal, pero los agentes G están diseñados para que actúen por inhalación debido a su alta presión de vapor, la elevada densidad de sus vapores (superior a la del aire) y su persistencia, y la inhalación es la vía de adsorción más eficiente debido a la amplia superficie del área pulmonar.

Tabla 1.2 Volatilidad [13] y toxicidad de los agentes neurotóxicos de la serie G y V.

Agente neurotóxico	Presión de vapor (Pa) a 25°C	Volatilidad (mg/m ³) a 25°C	AEGL2 (ppm [mg/m ³]) [14]	AEGL3 (ppm [mg/m ³]) [14]
			10 min	10 min
Sarín (GB)	387	20.000	0,015 [0,087]	0,064 [0,38]
Tabún (GA)	9	600	0,013 [0,087]	0,110 [0,76]
Somán (GD)	53,3	3.900	0,0057 [0,044]	0,049 [0,38]
VX	0,11	10,5	0,00065 [0,0042]	0,0027 [0,015]

AEGL2 (Acute Exposure Guideline Level 2): efectos adversos irreversibles, graves o de larga duración para la salud; o capacidad de huida disminuida.
AEGL3: causa daños incompatibles con la vida y/o muerte.

De entre estos, el gas sarín (GB) es el agente químico más letal ya que, aunque su toxicidad es inferior a la del Somán (GD) su volatilidad es 5 veces superior. El grupo de trabajo en detección de agentes químicos y biológicos en ambientes interiores de ERNCIP (*European Reference Network for Critical Infrastructure Protection*) ha reconocido como ataque terrorista altamente probablemente la liberación de Sarín en una estación subterránea de metro, similar al atentado de Tokio en 1995, o un centro comercial [15]. Por todo ello, este trabajo se ha enfocado en la identificación del gas Sarín, para demostrar la viabilidad de la técnica que proponemos. Sin embargo, considerando su alta toxicidad y a la CWC que prohíbe el desarrollo, producción, almacenaje y uso de armas químicas [12], este trabajo se ha desarrollado usando como molécula diana DMMP, metilfosfonato de dimetilo, como simulante del gas Sarín y a su vez de toda la serie G (ver apartado 2.3, pág. 52).

1.1.2 Pesticidas organofosforados

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organization*), un pesticida o plaguicida, es cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales [16]. Los pesticidas no son necesariamente venenosos, pero pueden ser tóxicos para los humanos y otros animales. De acuerdo a la Convención de

Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes [17], 9 de los 12 más peligrosos y persistentes compuestos son plaguicidas [18].

Los compuestos organofosforados son el principio activo de muchos pesticidas o plaguicidas comerciales. La fórmula de estos compuestos se caracteriza, en general, por tener tres ésteres como muestra la Figura 1.3:

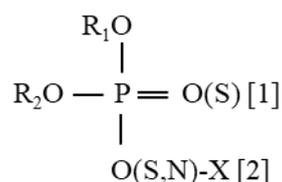


Figura 1.3 Formula general de los pesticidas organofosforados

En la que R_1 y R_2 son radicales alquilo, generalmente metilo o etilo, el grupo X es característico de cada especie química, con frecuencia un radical arilo, y suele contribuir de forma importante a sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Dependiendo de los elementos o grupos que ocupen las diferentes posiciones [1] y [2] los organofosforados pueden dividirse en 14 grupos, los más importantes son:

- Fosfatos: con un O en las posiciones [1] y [2];
- O-fosforotioatos o tionatos, con un S en [1] y un O en [2];
- S-fosforotioatos o tiolatos, con un S en [2] y un O en [2];
- Fosforoditioatos o tiolotionatos, con un S en [1] y [2];
- Fosfonatos, con O ó S en [1] y O en [2], y con R_1 en lugar de R_1O .
- Fosforoamidatos, con O en [1] y N en [2].

El metil-paratión (O,O-dimetil-O-4-nitro-feniltiofosfato) es uno de los pesticida organofosforado más potentes, prohibido en todas sus formulaciones y usos desde 2003 por la Unión Europea por ser muy tóxico para la salud humana, animal y ambiental [19,20]. Sin embargo, sigue siendo un potencial riesgo en otros muchos países. Además, el grupo de trabajo de ERNCIP ha reconocido la calidad del agua y su vulnerabilidad ante un derrame accidental o deliberado como un factor crítico en la salud pública actual [15]. Por ello, este trabajo se ha enfocado en la identificación del metil-paratión, pesticida que usado en grandes cantidades también puede actuar como agente neurotóxico. El metil-paratión se metaboliza rápidamente en ácido dietilfosfórico y paraoxon-metil, este último, menos tóxico, será la molécula diana durante este trabajo (ver apartado 2.4, pág. 63).

1.2 ESPECTROSCOPIAS VIBRACIONALES

La *espectroscopía* es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Un haz de luz puede ser absorbido, emitido, reflejado o dispersado por la materia dependiendo la estructura química de las moléculas: posición relativa de los átomos, tipo de enlace y estructura electrónica. Por tanto, el estudio de la luz tras su interacción con una molécula proporciona información sobre la estructura de esta. El diagrama de Jablonski ilustra los estados electrónicos de una molécula y las transiciones que se pueden producir entre estos estados tras la interacción con la luz (Figura 1.4).

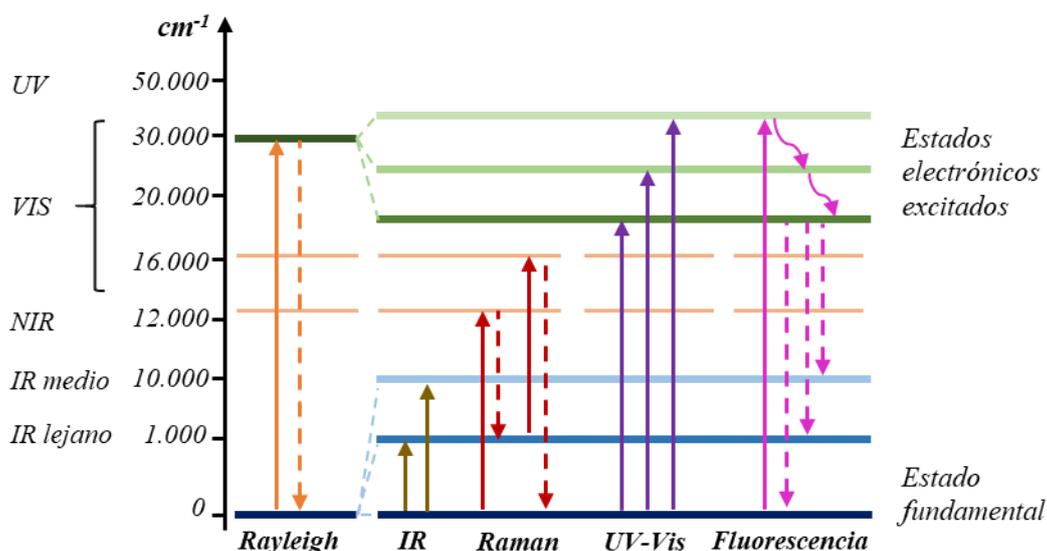


Figura 1.4 Diagrama de Jablonski en el que las líneas horizontales representan distintos estados vibracionales en el que se muestran las transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones luz-materia. Las transiciones radiativas están indicadas por medio de flechas rectas y las transiciones no radiativas por medio de flechas onduladas.

La espectroscopía UV-Vis implica la absorción de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible e infrarrojo cercano (NIR) desde el estado fundamental al excitado de la molécula [21]. La espectroscopía UV-VIS y la espectroscopía de fluorescencia son complementarias (Figura 1.4). En esta última, las colisiones con otras moléculas causan que la molécula excitada pierda energía vibracional por mecanismos no radiativos hasta que alcanza un estado vibracional excitado de menor energía. La molécula desciende luego a uno de los distintos niveles de vibración del estado electrónico basal, emitiendo un fotón en el proceso [22].

La espectroscopía vibracional es una herramienta básica que se utiliza en el estudio y caracterización de sistemas moleculares ya que nos proporciona la huella dactilar de

moléculas diatómicas o poliatómicas, iones moleculares y radicales libres. Las espectroscopías vibracionales IR y Raman son producto de la adsorción y la dispersión inelástica de fotones [23], respectivamente (Figura 1.4), y son técnicas fundamentales y complementarias a la hora de estudiar las frecuencias vibracionales de una molécula.

La espectroscopía IR es un tipo de espectroscopía de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético [24] (Figura 1.4). Los cambios en el momento dipolar de la molécula, μ , inducidos por la vibración de los núcleos, es decir, por el cambio en la posición relativa de los núcleos son responsables de las bandas de absorción registradas en los espectros IR. Estos cambios se interpretan como transiciones entre los niveles de energía vibracional de la molécula, de tal forma que cada banda de absorción infrarroja tiene una energía igual a la de una transición entre el estado basal y un estado excitado correspondiente a un modo normal de vibración de esta. Por tanto, las transiciones vibracionales activas en IR son aquellas que implican un cambio en el momento dipolar de la molécula.

El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el estudio de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz (Figura 1.4) [25,26]. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente. Se trata de una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar este ningún tipo de preparación especial y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no-destruktiva [26,27].

1.2.1 Efecto Raman

El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico indio Chandrasekhara Venkata Raman en el año 1928, lo que le supuso la concesión del premio Nobel de física en el año 1930. Este científico dio nombre al fenómeno inelástico de dispersión de la luz que permite el estudio de rotaciones y vibraciones moleculares [25,26].

Cuando los fotones del haz de luz incidente, con energía $h\nu_0$ mucho mayor a la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales, o rotacionales, de la molécula, interaccionan con ella, solo una pequeña fracción son dispersados de manera inelástica,

del orden de 1 fotón dispersado por cada 10^7 incidentes. La dispersión puede ser elástica si el fotón emitido tiene la misma frecuencia que el fotón incidente, entonces se conoce como dispersión Rayleigh (Figura 1.5 a). Por el contrario, la dispersión puede ser inelástica produciéndose un cambio en la frecuencia entre el fotón incidente y el dispersado (Figura 1.5b). Este cambio o desplazamiento puede producirse de dos maneras: dispersión Stokes o anti-Stokes (Figura 1.5c). En la dispersión Stokes el fotón cede energía a la molécula, por lo que la energía de la radiación dispersada es menor que la radiación incidente. En la dispersión anti-Stokes el fotón obtiene energía de la molécula, es decir, la energía de la radiación dispersada es mayor que la de la radiación incidente.

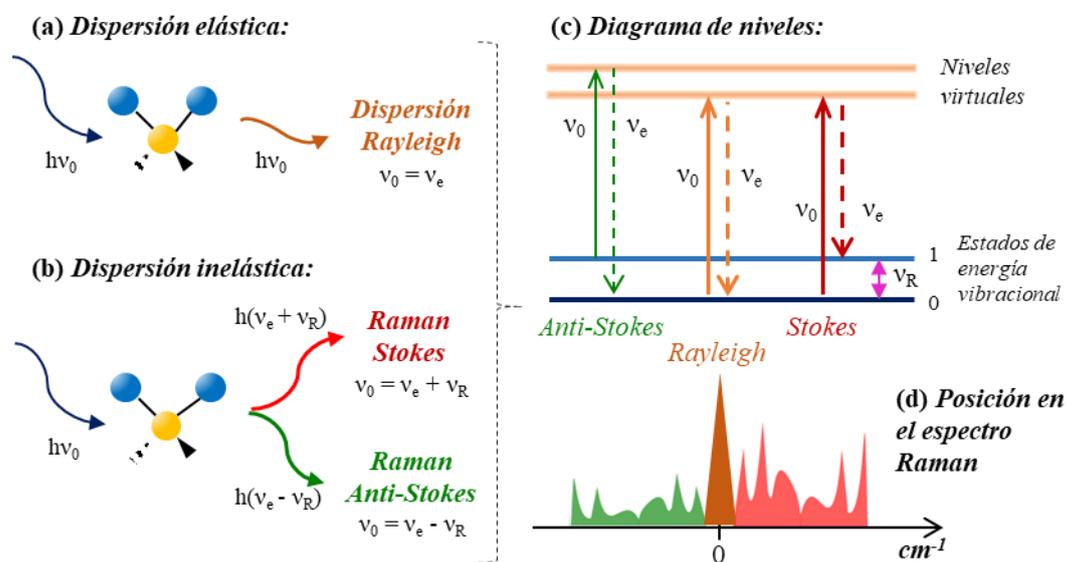


Figura 1.5 Tipos de dispersión de la radiación electromagnética tras la interacción con la materia: **(a)** dispersión elástica y **(b)** dispersión inelástica. **(c)** Diagrama de niveles de energía representando la dispersión Raman anti-Stokes, Rayleigh y Raman Stokes. **(d)** Posición de la dispersión representada en c) en el espectro Raman. h es la constante de Planck.

El espectro Raman está formado por una banda principal o Rayleigh y dos series de bandas secundarias correspondientes a las bandas Raman Stokes y anti-Stokes, situadas simétricamente a ambos lados de la banda Rayleigh (Figura 1.5d) [25]. El desplazamiento de las frecuencias Raman respecto de la frecuencia incidente ν_0 es independiente de esta última, y por ello suele tomarse este desplazamiento como abscisas para representar los espectros Raman, situando el centro de la banda Rayleigh como origen del eje. Así, la diferencia de energía entre el haz de luz incidente y el dispersado es llamada desplazamiento Raman y se calcula en número de ondas a través de la Ecuación 1.1:

$$\Delta E \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{1}{\lambda_{\text{incidente}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{dispersado}}} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde ΔE es el desplazamiento Raman en cm^{-1} ; $\lambda_{\text{incidente}}$ es la longitud de onda del haz de luz incidente en nanómetros (nm) y $\lambda_{\text{dispersada}}$ es la longitud de onda de la luz dispersada por la molécula en nm.

A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzmann¹, el 99% de las moléculas se encuentra en el estado vibracional de menor energía, y, por tanto, la probabilidad de que ocurran transferencias de energía que den lugar a la dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la de la dispersión Raman anti-Stokes. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior a la de la dispersión Raman anti-Stokes (Figura 1.5d). La diferencia de intensidad hace que habitualmente se trabaje midiendo solo el efecto Stokes.

La sección transversal, en inglés *cross-section*, en un proceso de óptica lineal está relacionada con la señal producida por ese proceso [28]. En nuestro caso, cuantos fotones incidentes son absorbidos y dispersados a través de un proceso Raman por una molécula dada. Esta absorción está relacionada con el área efectiva de la molécula. Cuanto más grande sea una molécula, mayor será su área de absorción, y, por tanto, mayor será la interacción entre el haz y la molécula, es decir, mayor señal Raman. Por eso moléculas, grandes y con anillos saturados reportan las mayores intensidades Raman [29]. La sección transversal también depende de la longitud de onda de excitación y del ángulo de recogida de los fotones dispersados. Las unidades son [$\text{cm}^2 \text{ sr}^{-1} \text{ molecule}^{-1}$], sr representa la eficiencia de la dispersión en una determinada dirección.

1

$$\frac{N_1}{N_0} = \frac{g_1}{g_0} e^{-\frac{\Delta E_v}{kT}}$$

Donde N_0 es el número de átomos en el estado inferior de vibración; N_1 , número de átomos en el estado superior de vibración; g_0 , degeneración del estado inferior de vibración, es decir, número de modos vibracionales de la misma energía; g_1 , degeneración del estado superior de vibración; ΔE_v , diferencia de energía entre estos dos estados vibracionales; k , constante de Boltzmann, $1,38 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$; y T , temperatura en Kelvin (K).

Además, para que en una molécula sea “activa” en Raman, se requiere de un cambio de la polarizabilidad molecular, parámetro que mide la deformidad de la nube electrónica como consecuencia de la interacción de la radiación electromagnética con la materia. La polarizabilidad de la molécula genera un momento dipolar inducido en esta, definido por la siguiente expresión:

$$\vec{\mu} = \alpha \cdot \vec{E} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Donde μ es el momento dipolar inducido, α la polarizabilidad molecular y E es la intensidad del campo eléctrico externo. Y es el carácter variable del campo, $E = E_0 \cdot \cos\omega_0 \cdot t$, el que convierte a este momento dipolar en un dispersor de radiación electromagnética.

En resumen, la espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural, es decir, la huella dactilar de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo su identificación. Además, al contrario que en la espectroscopía IR, el agua es transparente en Raman, lo que facilita el estudio en disoluciones acuosas. Sin embargo, solo una pequeña fracción de los fotones incidentes son dispersados inelásticamente, 1 fotón de entre 10^7 incidentes. Esta debilidad intrínseca hace que se precise del uso de fuentes de excitación láser, capaces de proporcionar una luz intensa, monocromática y coherente.

1.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFICIES (SERS)

El efecto SERS fue descubierto por Fleischmann et al. en 1974 [30] y consiste en un aumento de la dispersión inelástica, señal Raman, procedente de moléculas situadas cerca o en contacto con una nanoestructura metálica [31–33].

En concreto, en SERS, la amplificación de la señal Raman se produce por la interacción de la luz con los electrones de conducción situados en la superficie del metal [28,34]. Esta interacción genera una importante amplificación del campo electromagnético a través de la excitación resonante de los plasmones de superficie, cuya desexcitación da lugar a una intensificación del campo electromagnético cercano a la superficie. Dicho de otro modo, al acoplarse la polarización de la nube electrónica de las nanoestructuras metálicas con las de las moléculas se produce una amplificación de la

señal Raman de la propia molécula, es decir, las nanoestructuras actúan como una antena. El efecto SERS depende de varios parámetros, entre los que destacan: la composición, el tamaño, la morfología, la topología y el entorno dieléctrico de la superficie metálica nanoestructurada [34,35].

1.3.1 Propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas

El término plasmón de superficie (SP, de sus siglas en inglés *surface plasmon*) se refiere a la oscilación coherente de los electrones de conducción en metales, y materiales con electrones libres, como respuesta a un haz de luz incidente [36–38]. Si la radiación electromagnética incide sobre la interfase metal-dieléctrico se produce la excitación de los SPs generándose ondas electromagnéticas que se propagan a lo largo de la interfase, lo que se conoce como polaritones de plasmones de superficie (SPP, de sus siglas en inglés *surface plasmon polaritons*) [38,39], Figura 1.6 a. Estas oscilaciones pueden estar fuertemente confinadas a la interfase metal-dieléctrico, y actúan como una guía de ondas, siendo éstas evanescentes, es decir, que no se propagan ni en el interior del metal ni en el dieléctrico, y van perdiendo intensidad a medida que se propagan, hasta distancias de ~200 nm [39].

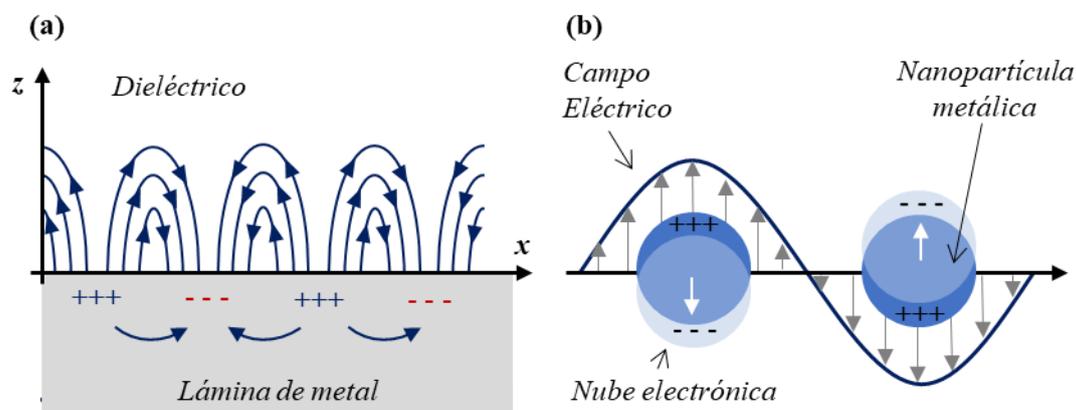


Figura 1.6 Representación esquemática de los plasmones de superficie: (a) modos SPP en la interfase metal-dieléctrico y (b) localizados en la superficie de una nanopartícula. Adaptada de [39].

Cuando las dimensiones de los materiales plasmónicos se encuentran en la escala nanométrica, nanopartículas, los SPPs dejan de existir y los modos electromagnéticos que tienen lugar se conocen como plasmones de superficie localizados (LSP, de sus siglas en inglés *localized surface plasmon*), los cuales están altamente influenciados por las condiciones del entorno [38,39], ver Figura 1.6b.

Para una partícula metálica de dimensiones mucho menores que la longitud de onda de la radiación incidente, es decir, $D \ll \lambda$, donde D es el diámetro de la partícula, los SPP se encuentran localizados. Esto da lugar a la formación de LSP que resuenen en una frecuencia determinada y que es función de la constante dieléctrica, la morfología y el tamaño de la nanoestructura. Si se hace incidir un fotón sobre la superficie en condiciones de resonancia con la frecuencia de los LSP, éstos son excitados, dando lugar al fenómeno conocido como resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR, de su siglas en inglés *localized surface plasmon resonance*) [39], este efecto a su vez conduce a la polarización de la NP como muestra la Figura 1.6b.

La Figura 1.7 muestra una comparación de las propiedades ópticas de varios metales, parte real y parte imaginaria de la constante dieléctrica, ϵ [40]. En todos los casos, la parte real $\text{Re}(\epsilon)$ pasa de tener un valor positivo, aunque pequeño en el UV, a valores negativos en el visible y muy negativos en la región del IR, excepto el aluminio que es siempre negativo. Este decaimiento es consecuencia de la respuesta óptica de los electrones libres o de conducción determinada por el modelo de Drude-Lorentz² [40,41]. Que la parte real, $\text{Re}(\epsilon)$, de la constante dieléctrica sea negativa, es el origen de los plasmones de resonancia de los metales en la región visible del espectro, debido a que esto se traduce en un índice de refracción menor a 1 llegando incluso a cero en los metales, mientras que en el resto de los materiales tienen un índice de refracción ≥ 1 [40,42,43]. El coeficiente de reflexión en la interfase metal-dieléctrico se deriva del índice de refracción, y un índice de refracción pequeño supone un coeficiente de reflexión cercano a uno, reflector perfecto, por eso está es una de las propiedades más importantes de los metales [28].

Además, los plasmones de resonancia están fuertemente influenciados por la absorción óptica, es decir, cuanto mayor es la parte imaginaria de la constante dieléctrica, $\text{Im}(\epsilon)$, mayores pérdidas tiene (Figura 1.7b). El “factor de calidad”, Q , cuantifica este efecto a través de la Ecuación 1.3 [44] y los resultados se muestran en la Figura 1.7c.

$$Q = \frac{\omega \left(\frac{d\epsilon'}{d\omega} \right)}{2(\epsilon''(\omega))^2} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

² El modelo de Drude-Lorentz proporciona una base de la mecánica clásica para la conductividad de los metales y se basa en la aplicación de la teoría cinética a los electrones en un sólido.

Donde ω es la frecuencia, $\epsilon' = \text{Re}(\epsilon)$ y $\epsilon'' = \text{Im}(\epsilon)$. Según está expresión, Q es mayor cuando $\text{Im}(\epsilon)$ es menor, y esto se traduce en un plasmón de resonancia más fuerte, más ancho.

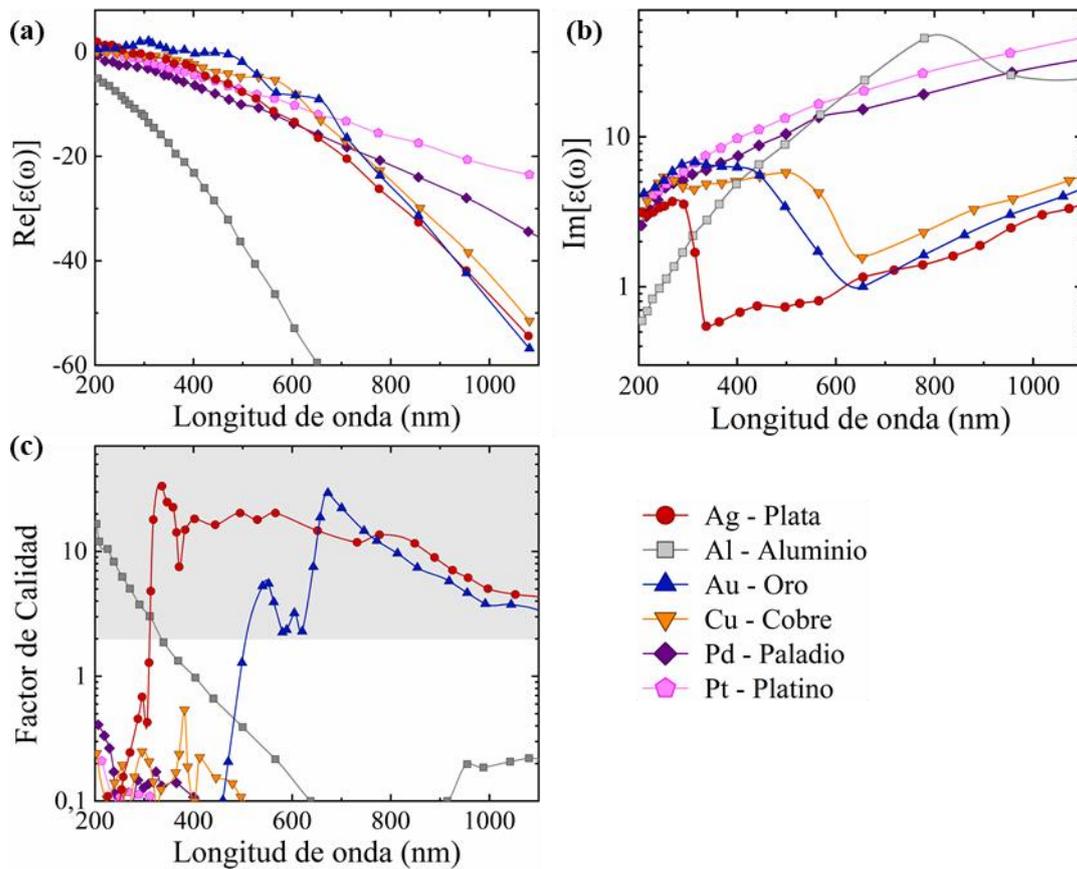


Figura 1.7 Propiedades ópticas de algunos metales en el rango del UV-Vis-IR: (a) Parte real y (b) parte imaginaria de la constante dieléctrica en función de la longitud de onda. (c) Factor de calidad de los LSPR para una nanopartícula metálica rodeada de aire. La zona sombreada representa el área de interés de la mayoría de las aplicaciones plasmónicas. Adaptada de [28].

Tras estas observaciones y teniendo en cuenta que la intensificación LSPR inducida por una esfera metálica depende de la polarización generada por el campo externo, y del momento dipolar asociado, que viene dado por la Ecuación 1.4 [45]:

$$\vec{p} = a^3 \frac{\epsilon(\omega) - 1}{\epsilon(\omega) + 2} \cdot \vec{E}_0 = g(\omega) \cdot \vec{E}_0 \quad \text{Ecuación 1.4}$$

siendo p la polarización de la nube electrónica, $\epsilon(\omega)$ la permitividad eléctrica del material, E_0 el campo aplicado y a el radio de la esfera. Con todo esto podemos considerar que un metal será adecuado en SERS cuando:

- $\text{Re}(\epsilon)$ sea negativa en el rango de longitudes de onda de interés. En general, $-20 \leq \text{Re}(\epsilon) \leq -1$.
- $\text{Im}(\epsilon)$ pequeña o Q grande en el rango de interés. Generalmente, Q debe de ser mayor a ~ 2 , y preferiblemente mayor a ~ 10 .

De entre los metales estudiados en la Figura 1.7, la plata es el metal con mejores propiedades ópticas en el rango del UV-Vis-IR. El oro y el cobre son adecuados en longitudes de onda mayores a 600 nm, llegando el oro a tener propiedades ópticas similares a las de la plata en este rango del espectro. Paladio y platino presentan una absorción muy alta para ser utilizados en SERS, mientras que el aluminio podría ser adecuado en aplicaciones que trabajen en el rango del UV [46], por ejemplo, el estudio de proteínas [47,48] o estudios catalíticos [49,50]. Además de estas consideraciones teóricas, a la hora de seleccionar el metal tenemos que tener en cuenta otros parámetros como son la disponibilidad, manipulación, toxicidad, durabilidad o coste [28]. Teniendo en cuenta su mejor estabilidad, el oro es el metal más prometedor a partir de 600 nm, aunque la plata puede ser muy útil para aplicaciones que requieran de un gran aumento de la señal, como la detección de moléculas aisladas, *single-molecule detection*.

1.3.2 Mecanismos de intensificación SERS

Para explicar el efecto SERS se han propuesto un gran número de mecanismos y múltiples variantes de cada uno de ellos, actualmente se acepta la existencia de dos contribuciones [28,33,34,51]: mecanismo electromagnético (ME) y mecanismo químico o de transferencia de carga (TC).

1.3.2.1 Mecanismo electromagnético (ME)

El mecanismo ME es el origen principal de la amplificación de la señal Raman en SERS y se produce por el acoplamiento del campo electromagnético del haz incidente con los plasmones de superficie *SP* de la nanoestructura metálica [33,35,39]. La amplificación de la señal a través del mecanismo EM se debe a dos procesos [33,52,53]:

- *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 por la suma de la intensidad del campo E_0 de la radiación incidente a la

frecuencia ω_0 y la del campo dispersado por el propio metal E_S a la misma frecuencia de oscilación (Figura 1.8):

$$E_{tot}(r', \omega_0) = E_0(r', \omega_0) + E_S(r', \omega_0) \quad \text{Ecuación 1.5}$$

Cuando la frecuencia ω_0 coincide con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal, el campo dispersado E_S resulta ser mucho mayor y la expresión anterior se puede aproximar a:

$$E_{tot}(r', \omega_0) \approx E_S(r', \omega_0) = g \cdot E_0(r', \omega_0) \quad \text{Ecuación 1.6}$$

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

$$p(r', \omega_0) = \alpha_R \cdot E_{tot}(r', \omega_0) \quad \text{Ecuación 1.7}$$

La dispersión Raman de la molécula tendrá así un campo eléctrico de intensidad E_R proporcional a $\alpha_R E_S$, y, por eso, para que una molécula sea activa en Raman tiene que ser polarizable.

- *Intensificación de la radiación Raman*

La Figura 1.8 muestra un esquema del fenómeno que tiene lugar en un proceso de dispersión Raman en ausencia y presencia de nanoestructuras metálicas.

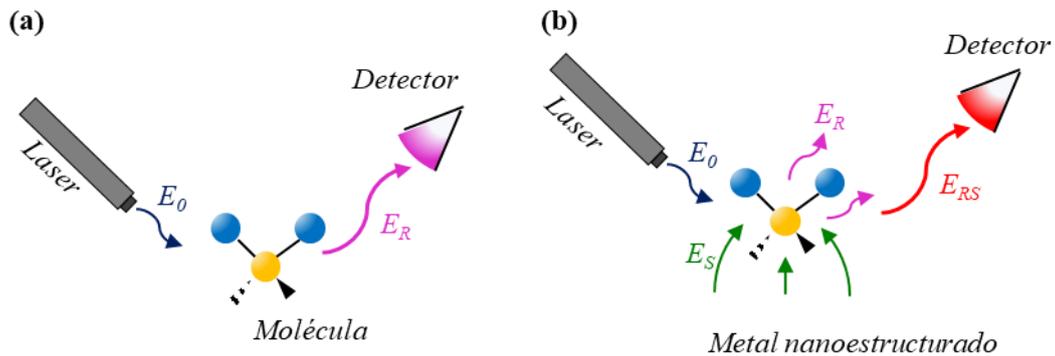


Figura 1.8 Proceso de dispersión Raman en ausencia (a) y presencia (b) de una nanoestructura metálica. E_0 radiación incidente; E_R radiación Raman dispersada por la molécula; E_S campo dispersado por el metal y E_{RS} campo dispersado por el acoplamiento de la molécula con el plasmón superficial de resonancia del metal.

La dispersión Raman de frecuencia ω_R puede ser amplificada a su vez por la nanoestructura, de la misma forma que la radiación incidente, con un factor g' . g' indica la intensificación del campo a la longitud de onda Raman, ω_R , la cual difiere 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 campo dispersado directamente por la molécula de intensidad $E_R(\omega_R)$ y el campo dispersado por la nanoestructura cuando son excitados los plasmones superficiales $E_{RS}(\omega_R)$:

$$E_{SERS}(r, \omega_R) = E_R(r, \omega_R) + E_{RS}(r, \omega_R) \quad \text{Ecuación 1.8}$$

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

$$E_{SERS} \approx E_{RS} \propto g' E_R \propto g' \alpha_R E_S \propto g g' \alpha_R E_0 \quad \text{Ecuación 1.9}$$

Y, por tanto, la intensidad SERS será proporcional al cuadrado del módulo de E_{SERS} :

$$I_{SERS} \approx |g g'|^2 |\alpha_R|^2 I_0 \quad \text{Ecuación 1.10}$$

donde I_0 es la intensidad del campo incidente, para bandas de bajo número de ondas, es decir, cuando la diferencia entre ω_R y ω_0 es mínima, $g \approx g'$ y la intensidad SERS será amplificada con un factor proporcional a la cuarta potencia de la amplificación del campo cercano local incidente $|g|^4$. Además, se puede definir un factor de intensificación G como:

$$G = \frac{I_{SERS}}{I_{Raman}} = \left| \frac{\alpha_R}{\alpha_{R0}} \right|^2 \cdot |g g'|^2 \quad \text{Ecuación 1.11}$$

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 de metal [54–56].

A partir de la Ecuación 1.10 y Ecuación 1.11, podemos decir 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 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 amplificaciones que produce el efecto SERS. Por ejemplo, para una nanopartícula de plata con el plasmón de resonancia a un máximo de 400 nm, g es ~ 30 , pero se produce una amplificación $G \sim 8 \times 10^5$, suponiendo que la polarizabilidad Raman no cambia respecto a la de la molécula aislada [57].
- La polarizabilidad Raman de la molécula puede alterarse drásticamente con respecto a la de la molécula aislada, variando su magnitud, simetría y propiedades de resonancia, cuando interacciona directamente con el metal. Esto resulta particularmente evidente en sistemas molécula-metal donde se realizan procesos TC.

Asimismo, el valor de G depende de varios factores: i) la morfología de la partícula metálica; ii) la distancia a la superficie, y iii) la permitividad dieléctrica del metal, ϵ , y la del medio que lo rodea ϵ_0 . El mecanismo EM predice factores de aumento de la señal Raman del orden de 10^6 , que coincide en gran medida con los valores G obtenidos experimentalmente [33,35,39,58]. Esta amplificación de la señal Raman la sentirán solo aquellas moléculas que se encuentren a una distancia de hasta ~ 10 nm de la superficie metálica [32–35,54,59,60]. En el caso de la esfera, la intensidad SERS disminuye con la distancia según la Ecuación 1.12 [59]:

$$I_{SERS} = \left[\frac{a+r}{a} \right]^{-10} \quad \text{Ecuación 1.12}$$

donde a es el diámetro promedio de la nanopartícula y r la distancia entre la molécula y la superficie del metal. El gradiente del campo EM existente sobre la superficie metálica hace que los modos vibracionales de los enlaces de la molécula que se encuentran más cercanos a la superficie sufran una mayor intensificación de su señal. Este efecto de la proximidad puede ser utilizado para conocer el mecanismo mediante el cual se produce la interacción entre la molécula y el metal puesto que las bandas que presenten mayores cambios de intensidad o desplazamiento estarán situadas más cerca del metal [61–63].

1.3.2.2 Mecanismo de transferencia de carga (TC)

El mecanismo de transferencia de carga (TC) se produce por un proceso fotoinducido que implica la transferencia de carga de un electrón del nivel de Fermi, E_f , hacia el orbital LUMO (de sus siglas en inglés *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) de la molécula absorbida sobre la superficie del metal [28,64–66], Figura 1.9 a. También puede ocurrir

el proceso contrario, que el electrón vaya del orbital HOMO (de sus siglas en inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*) de la molécula hacia el nivel de Fermi del metal, Figura 1.9b. El factor de amplificación debido a este mecanismo es del orden de 10^2 - 10^3 [35,67].

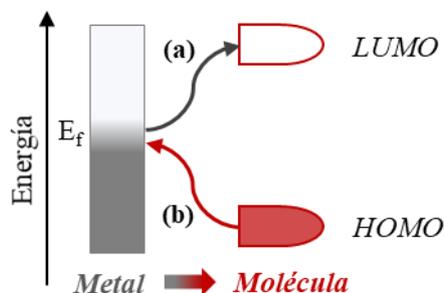


Figura 1.9 Esquema del mecanismo de transferencia de carga (TC) que ocurre entre el metal y la molécula en el efecto SERS. TC: (a) metal a molécula, E_f a LUMO y (b) molécula a metal, HOMO a E_f .

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 los espectros SERS serán muy parecidos al espectro Raman normal. Por el contrario, cuando la entalpía de adsorción es muy negativa y comparable a las energías de un enlace químico, quimisorción, la alteración del volumen de la nube electrónica del analito es significativa, sobre todo en el caso de moléculas pequeñas, y lo que obtenemos es un complejo superficial con diferente simetría y estados electrónicos. Además, desde el punto de vista de la amplificación de la señal, la adsorción directa sobre la superficie proporciona la máxima señal, dando origen al “efecto de la primera capa”. 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 TC entre el metal y la molécula, o viceversa [33,68].

La existencia de TC es función de la naturaleza de la molécula y del metal. Por ejemplo, la TC es más probable en moléculas que contienen electrones π en su estructura, tales como moléculas aromáticas. En cuanto al metal, la morfología de la superficie metálica también influye en el mecanismo TC, ya que este mecanismo tiene lugar mayoritariamente en puntos de la superficie en los que existen rugosidades superficiales a escala atómica, llamadas “*adatoms*” [69]. Por lo tanto, la fracción de moléculas que contribuyen a la amplificación SERS mediante TC es muy pequeña.

1.4 SUSTRATOS SERS

Un requisito importante para poder utilizar el SERS como herramienta analítica en aplicaciones de detección es el desarrollo de sustratos SERS reproducibles, robustos y uniformes [28,51,70–72]. La aplicación final determinará el tipo de sustrato SERS que necesitamos, material del soporte, metal plasmónico y método de fabricación. Por ejemplo, los estudios fundamentales para conocer la dependencia de la amplificación SERS con el tamaño y geometría del *hot-spot*, punto de máxima amplificación de la señal, requieren de métodos de fabricación capaces de moldear la estructura plasmónica a nivel de nanopartículas individuales. La precisión para alcanzar estos límites requiere tiempo, costes altos y es difícil de escalar.

Sin embargo, para aplicaciones de análisis químico los requisitos son otros: sustratos homogéneos, reproducibilidad en la fabricación, costes asequibles, fabricación sencilla, señal robusta, estabilidad, y afinidad entre el analito y el sustrato SERS. Son estos los requerimientos que tendremos que cumplir para poder utilizar nuestros sustratos SERS como sensores de agentes neurotóxicos y pesticidas. En la Figura 1.10 se detalla una lista de “buenas prácticas” para conseguir resultados SERS reproducibles.

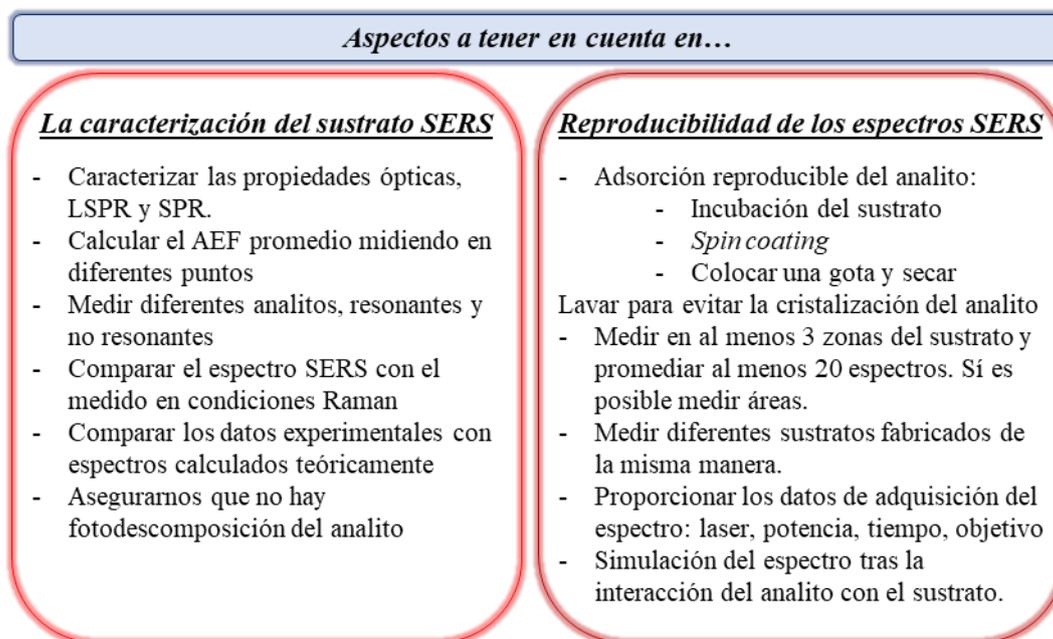


Figura 1.10 Aspectos prácticos para conseguir espectros SERS reproducibles. Adaptada de [70].

Los sustratos SERS pueden clasificarse en dos categorías según la metodología de fabricación: sustratos coloidales fabricados con métodos *bottom-up* y sustratos

nanoestructurados con la aproximación *top-down* (Figura 1.11a). En general, los sustratos *bottom-up* ofrecen una mayor amplificación de la señal, pero su fabricación es menos reproducible, y con los sustratos fabricados por *top-down* ocurre lo opuesto (Figura 1.11b).

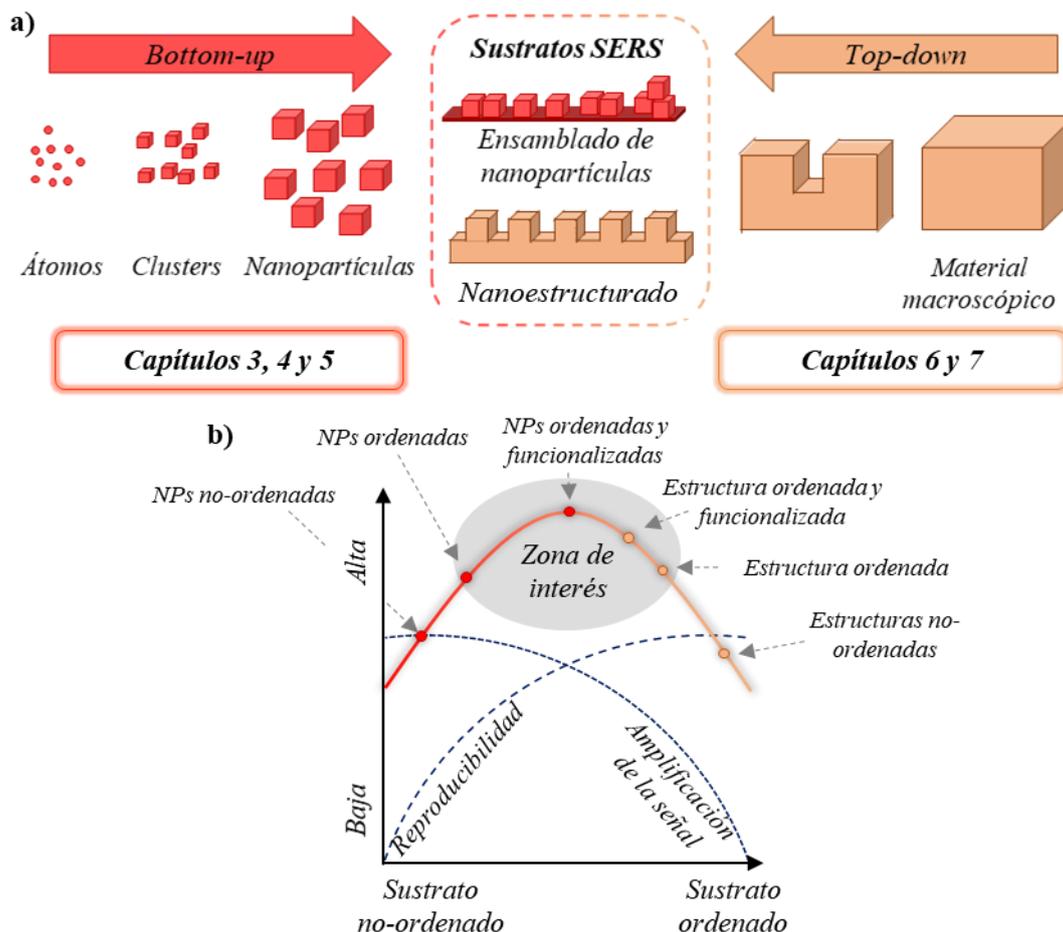


Figura 1.11 (a) Esquema de las dos metodologías para la fabricación de sustratos SERS: *bottom-up* y *top-down*, junto con los capítulos donde se han utilizado. (b) diagrama de cómo se modifican las propiedades SERS al cambiar de sustratos no ordenados a ordenados, adaptada de [73].

1.4.1 Sustratos coloidales: *Bottom-up*

1.4.1.1 Nanopartículas coloidales

Las nanopartículas coloidales de plata (Ag) y oro (Au) sintetizadas mediante la ruta *bottom-up* son los sustratos SERS más utilizados [51,74–77]. En la metodología *bottom-up* se parte de átomos o moléculas para formar nanopartículas que posteriormente se ensamblan o se depositan sobre un soporte blando o rígido. Sus principales características son su sencillez, rapidez, alto rendimiento y bajo coste.

Las nanopartículas las podemos clasificar en dos categorías según su morfología (Tabla 1.3): nanopartículas redondeadas: esferas, nanorods, y nanohilos, entre otros, y nanopartículas con ángulos: nanoestrellas, nanotriángulos, nanocubos y nanopoliedros superiores: octaedros, dodecaedros. Está demostrado que estas últimas morfologías producen una amplificación del campo eléctrico mayor que las nanopartículas redondeadas debido al confinamiento que se produce en sus puntas y vértices [78–82].

A su vez, las nanopartículas pueden ser monometálicas o bimetálicas dependiendo del número de metales que las componen [83–86]. Las nanopartículas bimetálicas se clasifican en *core-shell* o aleaciones dependiendo si los metales están “separados” o mezclados. La diferencia principal entre ambas configuraciones es que en las aleaciones se solapan las bandas de energía de los elementos que la constituyen, esto se traduce en un cambio de las propiedades dieléctricas, y, por tanto, del comportamiento plasmónico de la nanopartícula [87]. Sin embargo, en las *core-shell* la respuesta plasmónica es una mezcla de los plasmones individuales del *core* y del *shell* [88]. Mediante cálculos teóricos se ha demostrado que la morfología también afecta en la respuesta plasmónica de las nanopartículas híbridas [83,85]. En el caso de nanopartículas esféricas, el desplazamiento del máximo LSPR es proporcional al cambio de composición en la nanopartículas aleadas, mientras que en las *core-shell* no hay una tendencia proporcional. En el caso de nanorods y nanotriángulos, la aleación de dos metales produce una reducción de la amplificación plasmónica, mientras que en las configuración *core-shell* no se aprecia esta reducción y la posición del máximo LSPR viene definida por la geometría de la partícula. Finalmente, la incorporación de Au a nanopartículas de Ag le confiere a estas una mayor estabilidad pero pierden poder de amplificación plasmónica [85].

Tabla 1.3 Morfología, composición y síntesis de las nanopartículas plasmónicas más utilizadas. En rojo y azul los apartados y capítulos donde hemos usado cada una de las estrategias y en negrita el material de la nanopartícula.

Morfología	Estrategia de síntesis		
	Reducción Química (RQ)	Fotoreducción	Semillas metálicas + RQ* o RG**
Nanopartículas redondeadas			
Nanoesferas 	Ag: [89–91] Au : [92,93] Au/Ag: [94–96] Apartado 4.2	Ag: [97] Au : [98] Au@Ag: [99] Apartado 4.3	Ag: [100] Au : [101,102] Au@Ag: [103] Ag@Au: [104] Apartado 5.2
Nanorods 	Ag: [105] Au: [105–107]	Ag: [108] Au [109]	Ag: [110] Au: [111–114] Au@Ag : [115,116] Apartado 5.3
Nanohilos 	Ag: [117,118] Au: [119]	-	Ag: [120]
Nanopartículas con ángulos			
Nanoestrellas 	Ag: [121] Au: [122,123] Au/Ag: [124]	-	Ag: [125] Au: [122,126,127] Au@Ag: [128,129] Au/Ag: [130]
Nanotriángulos 	Ag : [131] Au: [132–134] Capítulo 3	Ag: [135]	Ag@Au: [136]
Nanocubos 	Ag: [137,138] Au: [92,139,140]	-	Ag: [141] Au: [142] Au@Ag: [143] Ag@Au: [144] Au/Ag: [145,146]
Polígonos superiores 	Ag: [137] Au: [139,140,147,148]	Ag: [149,150]	Au: [142]

*RQ, reducción química en el caso de monometálicas y Au@Ag core-shell.

**RG, remplazamiento galvánico en el caso de bimetálicas Ag@Au core-shell y aleaciones Ag/Au.

Las estrategias más utilizadas para la síntesis de nanopartículas monometálicas son la reducción química del precursor metálico [92], aunque también puede reducirse bajo luz UV [98,109,149]. En general, las geometrías más complejas, rods, triángulos, cubos o poliedros superiores, suelen sintetizarse a partir de semillas metálicas [112,113,141,142,151], y usando la estabilización dinámica que ofrecen diferentes iones

o moléculas que dirigen el proceso de crecimiento por una afinidad reversible con la superficie metálica [76].

Las nanopartículas bimetálicas Au@Ag *core-shell* se sintetizan a través de la reducción controlada del precursor de Ag en presencia de las nanopartículas o semillas de Au ya formadas que facilitan la cristalización de Ag sobre el núcleo de Au [103,143]. La configuración contraria es difícil de sintetizar por esta vía. En presencia de nanopartículas de Ag, los iones Au³⁺ producen un remplazamiento galvánico generando nanopartículas huecas [145,146]. Sin embargo, controlando la cinética de reacción se han crecido *shell* de Au sobre nanopartículas de Ag esféricas [104], triangulares [136] y cúbicas [144]. Las aleaciones de Ag y Au se pueden conseguir mediante una co-reducción simultánea de ambos precursores [95,96] o mediante un calentamiento a más de 250°C de nanopartículas *core-shell* [152,153]. La Tabla 1.3 resume la morfología, composición y las estrategias más utilizadas para sintetizar nanopartículas plasmónicas mono- y bimetálicas.

Todas estas estrategias de síntesis llevan asociada una química superficial que tiene sus ventajas y desventajas en la aplicación SERS final, por un lado, estabilizan a las nanopartículas coloidales cuando están en suspensión y pueden favorecer su interacción con el soporte SERS pero por otro lado pueden bloquear la adsorción del analito en la superficie metálica [154].

1.4.1.2 Ensamblaje sobre un soporte sólido

Al depositar las nanopartículas de manera uniforme sobre soportes sólidos se consiguen señales SERS más robustas y reproducibles [51,74,75,155]. Además, la accesibilidad del analito a las nanopartículas es mayor cuando están soportadas que cuando están en disolución. Otras ventajas de los soportes sólidos es que son más fáciles de manipular, transportar y almacenar. Se pueden fabricar siguiendo diferentes estrategias (Figura 1.12):

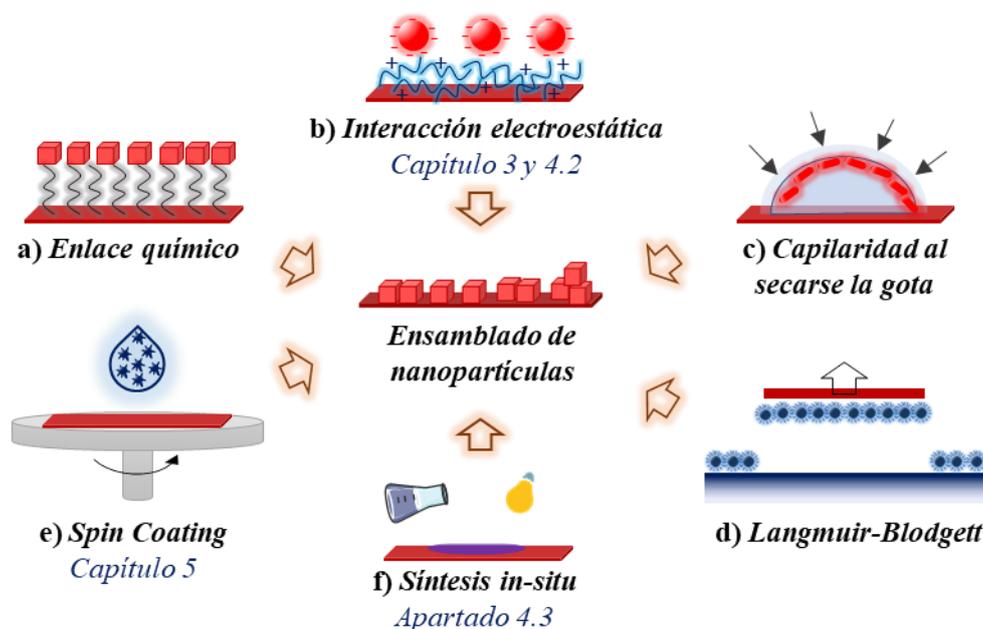


Figura 1.12 Esquema de las diferentes técnicas de ensamblaje de las nanopartículas a un soporte sólido.

- Autoensamblaje químico

Se basa en la utilización de moléculas bifuncionales, generalmente aminosilanos y mercaptosilanos, para inmovilizar las nanopartículas (Figura 1.12 a) [156]. La molécula se ancla por uno de sus grupos funcionales a la superficie del soporte dejando el otro libre para unirse con la nanopartícula [157–160]. Hay cuatro factores que afectan al anclaje: los grupos funcionales de la superficie del soporte, el tiempo de incubación del soporte en la suspensión de nanopartículas, la concentración de nanopartículas y la química superficial de las nanopartículas. Esta estrategia de anclaje también puede utilizarse con soportes blandos como el polidimetilsiloxano, PDMS [161,162].

- Autoensamblaje mediante interacción electrostática

El anclaje se produce por una interacción electrostática entre las nanopartículas y el soporte utilizando intermediarios poliméricos o proteínas (Figura 1.12b) [163]. Los polímeros más utilizados son polivinilpirrolidona (PVP) [164,165], polietilenamina lineal (LPEI) [166,167] y cloruro de poli(alildimetilamonio) (PDDA) [168–170] y dendrímeros [171,172]. El anclaje depende de los mismos factores que el anterior.

- Autoensamblaje por capilaridad

Se produce durante la evaporación de una gota que contiene las nanopartículas (Figura 1.12c). Este proceso es uno de los más utilizados por su sencillez y rapidez, aunque su reproducibilidad es menor debido al efecto “gota de café” que se produce en los bordes [173–175].

- Langmuir-Blodgett

En este procedimiento, en primer lugar, se crea la monocapa de nanopartículas sobre la interfase líquido-aire o líquido-líquido y posteriormente son transferidas al soporte sólido (Figura 1.12d). De este modo se han obtenido sustratos SERS homogéneos y con una alta densidad de nanopartículas de diferentes morfologías y tamaños [176–179]. La densidad de empaquetamiento, es decir, el espaciado entre nanopartículas, se controla a través de la presión de transferencia [177]. Este proceso de fabricación requiere mayor tiempo de preparación que los anteriores y es necesario que los ligandos que recubren la nanopartícula sean hidrófobos para así poder formarse la monocapa en la interfase. Pero a cambio ofrece un mayor control y mejor reproducibilidad.

- Recubrimiento por rotación: *spin coating*

Consiste en cubrir con la suspensión de nanopartículas el soporte sólido mientras este rota y por acción combinada de la fuerza centrípeta y la tensión superficial la disolución, el líquido se extiende formando una película homogénea, y tras evaporarse deja el material formando un recubrimiento homogéneo (Figura 1.12e) [180,181]. La densidad de empaquetamiento, monocapas o multicapas, pueden controlarse optimizando la velocidad de giro, la concentración de nanopartículas y el volumen dispensado [182–184].

- Crecimiento sobre el soporte sólido.

Otra opción es sintetizar directamente las nanopartículas sobre el soporte sólido (Figura 1.12f). Esta estrategia se ha aplicado sobre diferentes soportes: vidrio o óxido de silicio [127,169,179], polímeros [185–187], copolímeros bloque [188,189] o materiales mesoporosos [190,191]. También se han fotosintetizado nanopartículas sobre papel [192] o fibras ópticas [193].

1.4.2 Sustratos nanoestructurados: *Top-down*

En los métodos *top-down* se parte de un material macroscópico y se va reduciendo de manera controlada hasta formarse la estructura en la nanoescala (Figura 1.11a) [74,75,155,194,195], es decir, los sustratos SERS se pueden diseñar y preparar de manera directa. La fabricación *top-down* envuelve una gran variedad de técnicas litográficas, así como otros procesos químicos. En general, las técnicas *top-down* son más reproducibles y permiten un mayor control sobre el diseño final del sustrato SERS que las metodologías *bottom-up*, ver Tabla 1.4.

Tabla 1.4 Comparación de diferentes técnicas de nanofabricación de sustratos SERS ordenadas según su dificultad. Adaptada de [194].

Proceso de nanofabricación	Dificultad	Tiempo de realización	Defectos estructurales	Tamaño del sustrato	Coste
Litografía por haz de electrones (EBL)	++++	++++	Muy pocos	Pequeño	€€€€
Litografía por haz de iones focalizados (FIB)	++++	++++	Muy pocos	Pequeño	€€€€
Litografía óptica	+++	+++	Pocos	Grande	€€€
Litografía coloidal	+++	+++	Pocos	Grande	€€€
Sputtering de Ar⁺ <i>Capítulo 6</i>	+++	+++	Pocos	Grande	€€€
Litografía blanda o <i>soft lithography</i>	+++	+++	Pocos	Grande	€€€
Litografía por interferencia láser <i>Capítulo 6</i>	+++	+++	Muy pocos	Grande	€€
Litografía por nanoimpresión (NIL)	+++	+++	Pocos	Grande	€€
Langmuir-Blodgett*	++	+++	Pocos	Mediano	€€€
Autoensamblaje*	+	+++	Pocos	Grande	€€
Spin coating*	+	+	Alguno	Mediano	€€
Crecimiento <i>in situ</i> sobre el soporte sólido*	+	++	Alto	Grande	€€

*Son técnicas de fabricación *bottom-up*

La litografía por haz de electrones (EBL, de sus siglas en inglés *electron beam lithography*) es una técnica común para fabricar nanoestructuras SERS ordenadas y periódicas de diferentes morfologías: esferas [196], estrellas [197], huecas [198] y también bimetalicas [199] con una resolución de hasta 10 nm. En un proceso estándar el haz de electrones escanea la superficie, recubierta con una resina electrón- sensible, diseñando la nanoestructura. A continuación, se revela la resina y se evapora el metal deseado, y se retira la resina restante. Los principales inconvenientes de esta técnica es el tiempo que consume y el alto coste del equipamiento, por ejemplo, 1 cm² con motivos de 20 nm necesita 111 h, una oblea completa 700 veces más [200]. Similar al EBL, en la litografía por haz de iones focalizados (FIB) [201,202]. FIB también ha sido usado para fabricar antenas plasmónicas [203]. Una antena plasmónica o resonador óptico se define como aquel dispositivo capaz de transformar la radiación óptica en una energía localizada, absorbiendo el campo eléctrico incidente y confinándolo en sus extremos [204]. Por ejemplo, el sándwich Au (100 nm) – TiO₂ (40 nm) – Au (50 nm) tras un proceso de FIB fue transformado en dos antenas de 35 nm de longitud y 6 nm de espaciado capaces de interactuar y de detectar bajas concentraciones de colorantes [205].

La litografía óptica es un método muy generalizado y no muy costoso [206–208]. Comparado con EBL o FIB, la litografía óptica genera patrones con menor resolución, motivos de 500 nm a varias micras, debido a los límites de refracción de la luz, pero a cambio los sustratos pueden fabricarse a nivel de oblea con un alto rendimiento y uniformidad. Esta técnica va acompañada de una evaporación o deposición de los materiales plasmónicos.

Mediante un ataque reactivo con iones (RIE, de sus siglas en inglés *reactive ion etching*) en el que se controla de manera precisa la composición de la mezcla de gases reactivos se han fabricado sustratos SERS con una alta densidad de nanopilares de silicio y elevado ratio altura/grosor, y sin necesidad de utilizar una máscara litográfica [209,210]. Tras la metalización de la parte superior e inclinando el pilar se han alcanzado altos factores de aumento, 10⁶-10¹¹ dependiendo del protocolo de medida del aumento de señal [211].

El *sputtering* de Ar⁺ de diferentes materiales plasmónicos también ha sido ampliamente utilizado en la preparación de sustratos SERS. Se trata de un proceso físico en el que se produce la vaporización de los átomos del material plasmónico mediante el

bombardeo de iones de Ar [212]. El sputtering se ha combinado con el grabado por haz de iones (IBE, de sus siglas en inglés *ion beam etching*) para tener un mayor control de la morfología y el tamaño de las nanoestructuras [213,214].

La litografía coloidal ha sido una de las técnicas de nanofabricación más utilizadas ya que permite fabricar sustratos de hasta $10 \times 10 \text{ mm}^2$ de manera rápida [215,216]. Se trata de una litografía en la que esferas micro y submicrométricas autoensambladas en un empaquetamiento hexagonal compacto se utilizan como máscara litográfica para crear patrones plasmónicos. Se ha utilizado para crear patrones con nanotriángulos [215], o los famosos AgFONs donde se deposita una capa gruesa de metal sobre las esferas, sin llegar a retirarlas [216–219]. Estos sustratos han demostrado una uniformidad alta uniformidad a nivel de oblea (RSD < 10%), factores de aumento de entre 10^7 - 10^8 y cambiando el tamaño de la microesfera se puede desplazar su máximo SRP [217].

La litografía blanda o *soft lithography* es otra opción para fabricar o replicar sustratos SERS en materiales elastoméricos, especialmente PDMS [220]. Para ellos, los moldes de PDMS se estampan sobre disoluciones que contienen las nanopartículas plasmónicas, de este modo, las nanopartículas se empaquetan en el interior creando la forma tridimensional del molde [221]. Otra opción, para diseñar el molde de PDMS es estirarlo y encogerlo de este modo se crean surcos, arrugas, donde se depositaran las nanopartículas que posteriormente serán estampadas sobre diferentes soportes [222].

La litografía por interferencia láser ha sido utilizada para fabricar patrones lineales, nano-*gratings*, con una alta uniformidad y a escala de oblea [223,224]. Además, estos canales presentan una alta dependencia con la polarización del láser Raman y se han implementado en chips de microfluídica para la detección de contaminantes ambientales [223]. En todos los casos sobre los canales se evaporan capas de metales plasmónicos.

La litografía por impresión (NIL, de sus siglas en inglés *nanoimprint lithography*) es un proceso de fabricación con alta producción y resolución y bajo coste [225–227]. Las nanoestructuras se forman por deformación mecánica de un polímero fundido [228,229] y su posterior enfriamiento o de un monómero para su curado mediante temperatura [228] o luz [230,231].

A la mayoría de estos procesos en los que se fabrica la nanoestructura en diferentes materiales les sigue una evaporación del metal plasmónico [232], pero mediante

evaporación también se pueden crear sustratos SERS sobre una superficie planas [233] o fibras ópticas [234]. Cuando el espesor del metal es menor a 10 nm, el metal evaporado tiende a formar islas en lugar de una capa continua.

1.4.3 Sustratos SERS comerciales

El gran interés que en diferentes sectores ha generado la tecnología SERS ha hecho que muchas empresas hayan comenzado a comercializar sustratos SERS con diversas morfologías (Tabla 1.5).

Tabla 1.5 Sustratos SERS comerciales

Nombre comercial	Compañía	Metal	Morfología	Precio	Ref.
SERStrate	Silmeco (Dinamarca)	Ag y Au	Pilares de silicio recubiertos de metal	2 uds. 45€	[211,235]
Q-SERS	Nanova Inc., (USA)	N.D.	Nanopartículas de 15-60 nm sobre silicio	5 uds. 350€	[236]
SERS substrates	Ocean Insight (USA)	Au	Nanopartículas	1 uds. 65€	[237]
SERS substrates	Hamamatsu Photonics (Japón)	Au	Nanoestructuras sobre polipropileno	N.D.	[238]

N.D.: Información no disponible

1.5 AFINIDAD DEL ANALITO CON LA SUPERFICIE PLASMÓNICA

La amplificación de la señal Raman se produce a escasos nanómetros de la superficie del metal, por lo tanto, uno de los elementos más importante en el diseño de un sensor SERS recae en la naturaleza de la interacción entre el analito y la superficie plasmónica [51,239,240]. La interacción de los analitos con la superficie plasmónica es equivalente a la que ocurre en la catálisis heterogénea, incluye el transporte de moléculas a la interfase, la difusión a través de poros (si están presentes) y la adsorción en la superficie del sólido [154,239]. En muchos casos no existe una afinidad directa por lo que se requiere de mecanismos de captura del analito (Figura 1.13). Estos mecanismos de captura además proporcionan otras propiedades al sensor:

- i) pueden modificar la selectividad del sensor,

- ii) pueden concentrar el analito en la superficie SERS aumentando el límite de detección,
- iii) pueden permitir una detección directa del analito,
- iv) puede ser reversible,
- v) pueden anclar varios analitos,
- vi) pueden reducir el coste del sensor SERS al simplificar el proceso.

Además, la detección del analito puede ser directa o indirecta (Figura 1.13) [240]. En la detección indirecta se requiere de ligandos extrínsecos que introducen una molécula sonda para monitorizar de manera indirecta el analito (Figura 1.13-a). Las sondas suelen tener una alta afinidad con el analito, anticuerpos [241,242] o aptámeros [243,244], alcanzándose una detección muy específica, pero con poca información vibracional del analito. Esta metodología se ha utilizado para detectar agentes nerviosos, para ello, se funcionalizaron las estructuras plasmónicas con su molécula antídoto y se monitorizó la señal de esta tras la interacción con el agente nervioso [245]. Del mismo modo se identificó el pesticida paraoxon tras su reacción con la enzima acetilcolinesterasa [246]. En cambio, en la detección intrínseca se monitoriza directamente la huella vibracional del analito y se produce por fisisorción o quimisorción del analito en la superficie SERS a través de diferentes mecanismos (Figura 1.13b-e) [154].

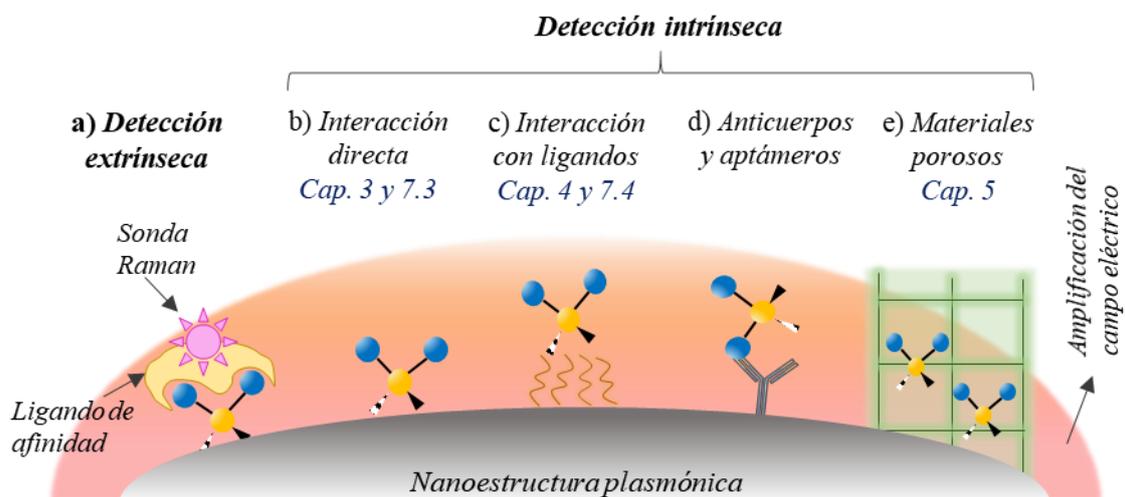


Figura 1.13 Esquema de los diferentes tipos de detección: **a)** extrínseca o indirecta, se monitoriza la señal de la sonda Raman que acompaña al ligando de afinidad; y la detección intrínseca o directa del analito que se puede subdividir en las siguientes interacciones metal-analito: **b)** directa; **c)** a través de ligandos; **d)** mediada por anticuerpos o aptámeros y **e)** adsorción en materiales porosos. Se adjunta el capítulo donde se utiliza cada uno de los anclajes.

La mayoría de los analitos contienen grupos funcionales como tioles, aminas, cianuro o ácidos carboxílicos, entre otros, que tienen una alta afinidad con la Ag y Au permitiendo una interacción directa (Figura 1.13b) [247]. Desafortunadamente, la síntesis de algunas nanopartículas suele requerir de agentes reductores, surfactantes o estabilizadores con estos mismos grupos funcionales que impedirían que el analito pueda interactuar con la superficie, por eso, deben evitarse en SERS o en su defecto lavar las nanopartículas antes de su uso [239]. Esta interacción se ha utilizado para detectar diferentes analitos en fase gas: bencenotiol [218], cianuro de hidrógeno [209] o NO₂ [248], así como, algunos pesticidas e insecticidas en fase líquida: paraoxon [249], clorpirifós [250] o thiram [251].

Las interacciones electroestáticas e hidrofóbicas son de las más utilizadas para anclar el analito al metal (Figura 1.13c). A la hora de elegir el ligando hay que tener en cuenta: *i*) su longitud, cuanto de lejos estará el analito de la superficie; y *ii*) sus propiedades Raman, que sus bandas vibracionales no interfieran con las del analito. En la mayoría de las síntesis de nanopartículas el agente estabilizante son iones negativos como el citrato. Los analitos cargados positivamente, como los colorantes catiónicos, serán anclados mediante atracción electroestática, mientras que aquellos compuestos orgánicos con carga negativa no podrán ser anclados. Una posible solución es la acidificación que aumentará la fuerza iónica pero también aumentará la concentración de protones en el medio, disminuyendo la carga negativa de los grupos carboxilato del citrato [252]. Además, la acidificación también afecta al analito, los ácidos orgánicos se vuelven menos negativos mientras que las aminas más positivas, aumentando la señal SERS a pH bajos. Una alternativa al citrato y de carga opuesta son los grupos amino o aminoácidos que no contienen grupos tiol que puedan pasivar la superficie [253]. Por su parte, las interacciones hidrofóbicas son adecuadas para compuestos orgánicos apolares que no contienen grupos funcionales, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs, *polycyclic aromatic hydrocarbons*), para ello una buena estrategia es funcionalizar la superficie con grupos alquilo [77,254], calix[4]arenos [255] o ciclodextrinas [256].

Los anticuerpos (Ab) son inmunoproteínas (~150 kDa) expresadas por los linfocitos B como parte de la respuesta inmunitaria que contienen sitios de reconocimiento molecular muy específicos a un determinado analito, antígeno [257]. El acoplamiento del Ab al metal se produce por una interacción entre los grupos funcionales del Ab y los ligandos que recubren al metal, generalmente alquiltioles o alquilaminas (Figura 1.13d) [258]. Este tipo de interacción se ha utilizado especialmente en la detección de moléculas

grandes: proteína IgG [259] o proteínas amiloides, biomarcadores de la enfermedad del Alzheimer [260]. Los aptámeros son hebras sencillas de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) diez veces más pequeños que los Ab, pero con la misma especificidad hacia el analito [261]. Se han empleado en la detección de moléculas pequeñas como cocaína [243], contaminantes policlorobifenilos (PCB) [262] o pesticidas como el malatión [263].

La idea de los materiales porosos es rodear al metal plasmónico con una matriz capaz de atrapar y retener al analito (Figura 1.13e). Las nanopartículas híbridas sílica (SiO_2)-metal plasmónico han sido aplicadas en diferentes tipos de sensores [264]. La sílice proporciona un gran superficie específica y un tamaño de poro homogéneo y modificable para la adsorción de diferentes analitos. En SERS, principalmente se ha utilizado la combinación $\text{SiO}_2@Au$ *core-shell* donde la sílice adsorbe los analitos y los concentra cerca de la superficie del metal [265,266], o incluso puede actuar de tamiz molecular seleccionando los analitos según su tamaño [191]. También en los últimos años, la combinación contraria ha sido utilizada para concentrar e identificar el fungicida thiram en bajas concentraciones, 12 ng/L [251]. La preconcentración en MOFs (*metal-organic frameworks*) es otra alternativa para detectar PAHs en fase gas [178,267,268].

Además, para la detección de analitos en fase gas se pueden utilizar otras estrategias más complejas. Entre ellas enfriar el sensor para provocar la condensación sobre el material plasmónico [269], evaporar solventes para disolver las moléculas [270], aplicar una diferencia de potencial para acumular las moléculas sobre el metal [271] o aumentar la frecuencia de colisión del analito [272].

1.6 SIMULACIÓN DEL CAMPO ELECTROMAGNÉTICO

El uso de modelos teóricos es esencial para entender el efecto SERS y poder interpretar y predecir los resultados experimentales obtenidos bajo diversas condiciones [51,85,273,274]. El método de Diferencias Finitas en el Dominio del Tiempo (FDTD, de sus siglas en inglés *finite-difference time-domain*) se usa comúnmente en la simulación de sistemas fotónicos con tamaños en la escala de la longitud de onda de excitación. Se trata de un método que calcula la evolución del campo electromagnético en función del tiempo [275]. FDTD es un método sencillo, flexible y robusto que puede ser utilizado para simular con precisión estructuras de diversa geometría, propagación omnidireccional

y materiales de diferente naturaleza: dieléctricos, magnéticos, dependientes de la frecuencia, no lineales y materiales anisotrópicos. Se ha utilizado para diseñar componentes en un amplio rango de aplicaciones: diseño de antenas, cristales líquidos, nanopartículas, plasmónica, cristales fotónicos, metamateriales o celdas solares. En SERS permite el estudio de la amplificación del campo eléctrico que se produce sobre la superficie del metal tras su interacción con la luz [276]. A modo de resumen podemos decir que las principales ventajas del método FDTD son:

- i) Resuelve las ecuaciones de Maxwell³ para geometrías complejas, donde el rendimiento del dispositivo puede no ser intuitivo y donde no existen métodos analíticos para predecir su comportamiento;
- ii) Permite estimular dispositivos que tienen tamaños de características del orden de la longitud de onda o menor. Esto es cuando la óptica geométrica, como la ley de Snell, se rompe, lo que significa que los métodos de “trazado de rayos” no darán resultados precisos;
- iii) Puede obtenerse en una sola simulación la respuesta de un rango amplio de frecuencias utilizando como fuente un pulso;
- iv) Permite encontrar frecuencias de resonancia y anchos de banda con exactitud;
- v) Calcula los campos eléctrico \vec{E} y magnético \vec{H} en toda la región de longitudes de onda de interés.

En FDTD, las ecuaciones de Maxwell se resuelven numéricamente dentro de una celda discreta en espacio y tiempo, llamada celda de Yee. El algoritmo de Yee centra las componentes del campo \vec{E} en los vértices de la celda y la componente del campo \vec{H} en el centro de las caras de la celda [277]. La continuidad de los campos \vec{E} y \vec{H} , se mantiene a través de cualquier interfase entre diferentes medios permitiendo que no haya que poner condiciones de contorno especiales, sino que basta con definir tanto la permeabilidad como la permitividad de cada material. La desventaja del algoritmo de Yee y a su vez del método FDTD es que se requiere un mallado en toda la región de trabajo, con una

³ Las ecuaciones de Maxwell son cuatro: ley de gauss, ley de gauss del magnetismo, ley de Faraday y ley de Ampère, definidas, respectivamente, a continuación:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \rho; \quad \vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0; \quad \vec{\nabla} \cdot \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}; \quad \vec{\nabla} \cdot \vec{H} = \vec{j} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$$

Donde D es la densidad de flujo eléctrico, ρ es la densidad de carga en el medio interior a la superficie cerrada; B es la densidad de flujo magnético ó inducción magnética; E es el campo eléctrico; t es el tiempo; H es el campo magnético y J es la densidad de corriente sobre la superficie.

discretización suficientemente fina como para resolver los detalles más pequeños de la geometría, lo que aumenta mucho el tiempo de simulación.

Por otro lado, debido a la memoria finita de los ordenadores, se debe acotar la celda de simulación, limitando así el espacio en el que se calculan los campos (Figura 1.14) [276]. En aplicaciones de dispersión es necesario establecer condiciones de contorno que simulen un espacio abierto, es decir, condiciones de frontera que simulen ondas electromagnéticas propagándose más allá del espacio de simulación, se conocen como condiciones de frontera absorbentes [275]. Estas condiciones evitan que la onda, tras incidir en ellas, se refleje de nuevo hacia el material. Las más utilizadas y las que mejores resultados ofrecen son las fronteras PML (*Perfect Matched Layer*) que constituyen un medio de espesor finito que rodea el espacio de simulación creando una condición de impedancia que impide la reflexión de las ondas, independientemente de su ángulo de incidencia y de su frecuencia. Además, en el caso de estructuras periódicas se puede reducir tiempos simulando la mínima celda unidad que contenga a una estructura completa, colocando en los ejes correspondientes condiciones de contorno periódicas.

La fuente de excitación se aplica como un pulso en función del tiempo que se propaga a través de la celda de simulación e interactúa con el medio y la nanoestructura (Figura 1.14). En nanoestructuras plasmónicas cuando las estructuras son más pequeñas que el *spot* del láser de excitación experimental se utiliza como fuente de excitación una onda plana de amplitud 1, en caso contrario, la fuente de excitación será una haz gaussiano con anchura igual al tamaño del *spot*.

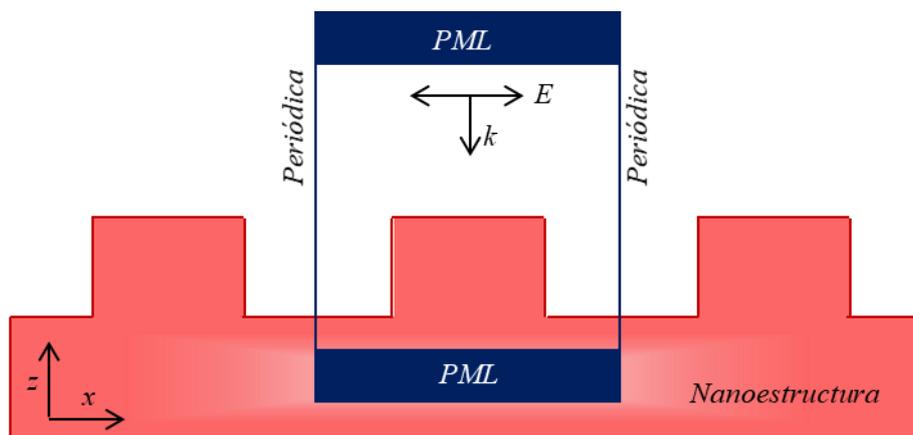


Figura 1.14 Esquema de una celda unidad en una simulación FDTD modelo. Adaptada de [276]

1.7 EQUIPOS RAMAN PORTABLES

La detección *in situ* es uno de los requerimientos más importantes que debe cumplir la tecnología SERS para ser implementada en la detección de compuestos organofosforados, especialmente agentes neurotóxicos (Figura 1.1, pág. 4). Actualmente, existen equipos Raman portables comerciales con buena resolución, pequeños y económicamente accesibles. La Tabla 1.6 muestra algunos ejemplos junto con sus características más importantes. Los precios rondan entre los 10-50 k€ dependiendo de las características y si se incluyen o no librerías de espectros y el algoritmo asociado para la identificación.

Tabla 1.6 Equipos Raman Portables comerciales y sus principales características

Equipo	Longitud de onda (nm)	Potencia (mW)	Resolución espectral (cm ⁻¹)	Peso (g)	Batería (h)	Ref.
Thermo Scientific FirstDefender RM	785	75-250	7-10.5	800	>4	[278]
Analytik DeltaNu ReporteR	785	70-100	12	430	>4	[279]
NanoRam B&K Tek Model: BWS456	785	30-300	9	1200	>4	[280]
Serstech 100 Indicator	785	Max. 300	10	650	8	[281]
Bruker, BRAVO	700/1000	<100	10-12	1500	>4	[282]

1.8 TECNOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

1.8.1 Detección de agentes neurotóxicos

Además de los sensores ópticos en los que se engloba la tecnología SERS, los sistemas de detección pueden clasificarse en resistivos, másicos y biosensores (Tabla 1.7). Los sensores ópticos basados en fluorescencia o colorimetría han sido utilizados en la detección de este tipo de compuestos. Sin embargo, los sistemas resistivos más sencillos, sensibles y estables han sido más ampliamente utilizados. Se basan en medir como

cambian las propiedades de conducción de un material sensible tras interactuar con el analito. Los sensores de onda acústica superficial (SWA, del inglés *surface-acoustic waves*) son utilizados habitualmente como sensores másicos. Estos miden el cambio de frecuencia de resonancia del sensor tras la interacción del analito con este, ofreciendo una gran sensibilidad. Los sensores electroquímicos se basan en la reacción entre el analito y un electrodo de trabajo funcionalizado. Cuando se funcionalizan con proteínas o enzimas se denominan biosensores. En estos casos la interacción es muy específica alcanzándose una alta sensibilidad.

Tabla 1.7 Ejemplos de sensores ópticos, resistivos, másicos y biosensores reportados en la literatura para la detección de agentes químicos en fase gas. Se han seleccionado ejemplos en los que el límite de detección fuera inferior a 10 ppmV.

Tipo de sensor	Material sensible/adsorbente	Límite de detección	Ref.
Óptico – colorimétrico	Cristales líquidos dopados con cobre	3 ppbV de DMMP	[283]
Óptico – fluorescencia	Papel funcionalizado con un polímero	25 ppbV de DCP	[103]
Resistivo	Nanotubos de carbono funcionalizados con grupos hidroxilo	50 ppbV de DMMP	[284]
Resistivo	Nanotubos poliméricos conductores	10 pptV de DMMP	[285]
Másico	SAW funcionalizado con polímeros electroespineados	40 ppbV de DMMP	[286]
Másico	SAW funcionalizado con polímeros	1,5 ppbV de DMMP 2 ppmV de CEES	[287]
Biosensor electroquímico	Sensor electroquímico funcionalizado con la encima acetilcolinesterasa	630 ppb de Sarin*	[288]

*Analito en fase líquida.

HCN: cianuro de hidrógeno; DMMP, dimetil metilfosfonato; DCP, dietil clorofosfato; CEES, 2-cloroetilsulfuro.

También existen equipos comerciales portables basados en estas tecnologías disponibles para la detección e identificación de gases neurotóxicos en fase gas, la Tabla 1.8 presenta alguno de ellos. Estos equipos se caracterizan por su alta especificidad hacia un agente nervioso por lo que si se quisiera cubrir un amplio rango de riesgos sería necesario el uso de varios de estos equipos.

Actualmente, estas técnicas para la detección de agentes químicos se desvían en mayor o menor medida de la idealidad, Figura 1.1, cuando se analizan conjuntamente

tamaño, coste, sensibilidad, tiempo de respuesta, especificidad, precisión, reversibilidad y reutilización. De entre ellas, la espectrometría de movilidad iónica (IMS) es actualmente la tecnología líder, existiendo equipos comerciales como *ChemProX* de Environics [289]; adaptados a las necesidades de la comunidad NRBQ. Sin embargo, la identificación de mezclas complejas sigue siendo un desafío y particularmente la detección de agentes nerviosos en fase gas a nivel de ppb, ya que la tasa de falsas alarmas es muy elevada. Además, el uso de fuentes radiactivas para la ionización de la muestra impone rutinas de mantenimiento específicas y de alto coste.

Tabla 1.8 Detectores comerciales de agentes neurotóxicos basados en tecnologías alternativas al SERS.

Nombre del producto	Metodología de detección	Especificaciones técnicas	Precio	Ref.
AP4C	Espectroscopía de llama	Dimensiones: 38×10×14 cm Peso: 2,1 kg Tiempo de repuesta: 10-15 s	102.000 €	[290]
ChemProX	Espectroscopía de movilidad iónica + sensores semiconductores	Dimensiones: 16×10×5 cm Peso: 0,8 kg Tiempo de repuesta: 1-3 min	9.000 €	[289]
FIDO C3	Biosensor enzimático	Dimensiones: 20×34×18 cm Peso: 6,8 kg Tiempo de repuesta < 5 min	N.D.	[291]
FIDO X3	Fluorescencia	Dimensiones: 37×11×7 cm Peso: 1,4 kg Tiempo de repuesta < 5 min	N.D.	[291]
Hardened MobilTrace	Espectrometría de movilidad con trampa iónica	Dimensiones: 44×16×33 cm Peso: 5,5 kg Tiempo de repuesta < 12 s	28.000 €	[292]

N.D.: Información no disponible

1.8.2 Detección de pesticidas

Existen muchos métodos para determinar la concentración de pesticidas en agua, frutas o suelos [293]. La metodología clásica y más utilizada en la detección de estos compuestos son la cromatografía de gases-masas (GC-MS), la cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas (CL-MS), y la cromatografía líquidos de alto rendimiento rendimiento-masas (HPLC-MS) debido a su alta selectividad y sensibilidad, pero están limitadas por su tiempo de operación, tamaño, peso y precio, además de requerir

experiencia para su manejo [294,295]. Por eso, en los últimos años, han comenzado a utilizarse otros sensores o biosensores que en comparación con las metodologías clásicas son más simples, precisos, selectivos y menos costosos. La Tabla 1.9 resume ejemplos de estos tipos de sensores y sus límites de detección.

Tabla 1.9 Tipos de sensores reportados en la literatura para la detección de pesticidas.

Metodología de detección	Material sensible/adsorbente	Límite de detección	Ref.
GC-MS	Columna cromatográfica de sílica, <i>Rxi®-5SilMS</i> (15 m × 0.25 mm, 0.25 μm)	100 ng/L de carbofurano	[296]
CL-MS	Nanotubos de carbono hidrofobados	2000 ng/L de carbofurano	[297]
UHPLC-MS	Columna de intercambio iónico, <i>Metrosep A Supp</i> (250 mm × 4 mm, 4,9 μm)	250 ng/L de glifosato	[298]
Biosensor óptico - colorimétrico	Inmunoensayo colorimétrico usando AuNPs funcionalizadas con ADN	10 μg/L de glifosato	[299]
Óptico - fluorescencia	<i>Quantum Dots</i> sobre imprimidos molecularmente	500 ng/L de difenoconazol*	[300]
Másico	QCM funcionalizado con ligandos tiol y sobre estos el inhibidor del clorpirifós	35 ng/L de clorpirifós	[301]
Biosensor electroquímico	Nanotubos de carbono funcionalizados con ADN	0.35 ng/L de clorpirifós	[302]

**fungicida*
QCM: microbalanza de cuarzo

1.9 OBJETIVOS

Como se ha ido señalando, la detección de compuestos organofosforados en fase gas frente a un posible ataque con armas químicas es crucial para garantizar la seguridad ciudadana. Asimismo, la detección de estos compuestos en fase líquida puede ayudar a la conservación del medio ambiente.

En este contexto, esta tesis doctoral se ha focalizado en el desarrollo de nuevas plataformas sensibles basadas en la tecnología SERS para detectar e identificar compuestos organofosforados en fase gas y líquida. Se han desarrollado sustratos SERS combinando diferentes metales, nanoestructuras plasmónicas y agentes de afinidad. La presente tesis cubre los siguientes objetivos:

- Diseñar una metodología de trabajo y medida Raman-SERS robusta y reproducible que ayude a comparar las diferentes plataformas SERS desarrolladas en términos de propiedades plasmónicas y de detección de compuestos organofosforados, bien en fase líquida o en fase gas.
- Identificar, caracterizar y en su caso sintetizar nanopartículas de Ag y Au o híbridas con plasmones de absorción en el rango de 600-800 nm.
- Explorar distintos métodos de deposición de las nanopartículas sobre soportes sólidos que permitan el acoplamiento del plasmón de resonancia de nanopartículas adyacentes haciendo máxima la amplificación de la señal Raman.
- Identificar nanoestructuras *top-down* y caracterizar sus propiedades plasmónicas.
- Investigar distintas estrategias para mejorar el anclaje del analito a la superficie metálica. Entre estas estrategias están la interacción directa, interacciones electroestáticas o la adsorción en los poros de materiales adsorbentes.
- Evaluar en las plataformas SERS desarrolladas las características de los sensores: selectividad, sensibilidad, tiempo de respuesta, estabilidad, reusabilidad, y detección en condiciones de campo.
- Integración de los sistemas SERS en chips de microfluídica compactos.
- Estudiar de manera teórica la amplificación del campo electromagnético sobre la superficie del metal con el objetivo de predecir e interpretar el efecto SERS utilizando el método computacional de Diferencias Finitas en el Dominio del Tiempo, FDTD.

Capítulo II

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL RAMAN-SERS

Resumen

En este capítulo, se describen los equipos de espectroscopía Raman y la metodología Raman-SERS seguida en la caracterización de los sustratos SERS fabricados en el desarrollo de esta tesis. Se detalla el cálculo del Factor de Aumento Analítico de los sustratos SERSs, la huella dactilar y la asignación de bandas de las moléculas patrón, agentes neurotóxicos y pesticidas. Asimismo, se describen los sistemas de generación de vapores y sistemas experimentales utilizados en la detección SERS en fase gas.

2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL RAMAN-SERS

2.1 INSTRUMENTACIÓN RAMAN

2.1.1 Equipo Raman de sobremesa

En primer lugar, los sustratos SERS se caracterizaron con un equipo de sobremesa Alpha 300 Raman Spectrometer de Witec que combina la alta eficiencia del detector Raman (2 cm^{-1}) con un microscopio confocal de alta resolución (Figura 2.1a). Este sistema nos permite obtener espectros Raman en una geometría de *backscattering*, es decir, la luz reflejada o dispersión Raman se recoge con el mismo objetivo de iluminación, para lo cual el sustrato SERS se sitúa en un ángulo de 90° con respecto a la fuente de excitación (Figura 2.1b). Esta configuración asegura que solo la luz proveniente del plano focal pueda alcanzar el detector aumentando el contraste de la imagen. La luz reflejada es transportada por una fibra óptica multimodo hasta el detector, consistente en cámaras CCD de alto rendimiento cuántico (refrigeradas a -65°C). El equipo consta de dos detectores, uno para el rango del visible y otro para el infrarrojo cercano, y de cuatro fuentes de excitación con longitudes de onda de 488 nm, 532 nm, 633 nm y 785 nm, y una potencia máxima de 41 mW, 32 mW, 18 mW y 272 mW, respectivamente.

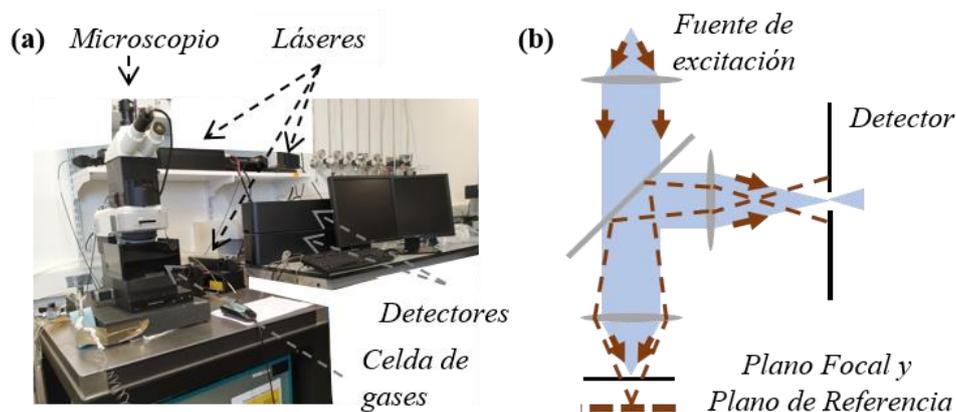


Figura 2.1 (a) Equipo Raman de sobremesa Alpha 300 y (b) esquema de la configuración del microscopio utilizado durante la caracterización de los sustratos SERS.

El área de iluminación del láser o *spot*, la resolución espacial y la penetración del láser en la muestra son parámetros del equipo que debemos conocer. El área de

iluminación del láser depende del diámetro del disco de Airy⁴ formado por el láser cuando está enfocado (d), y que a su vez depende de dos parámetros (Ecuación 2.1): la longitud de onda de la fuente de excitación (λ) y la apertura numérica del objetivo (N.A.), característica de cada objetivo, que indica el rango de ángulos en los que el objetivo puede emitir o aceptar luz a una distancia fija.

$$d = \frac{1,22 \cdot \lambda}{N.A.} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

La resolución lateral viene definida por el criterio de Rayleigh [303]. El criterio de Rayleigh expone que dos líneas espectrales son distinguibles si el máximo de uno coincide con el primer mínimo del otro. Así, la distancia entre dos puntos de medida tiene que ser mayor a la distancia entre el máximo de un disco de Airy y el mínimo el siguiente, por tanto, la máxima resolución espacial viene determinada por el radio (r) del disco de Airy (Ecuación 2.2) formado por el láser.

$$r = \frac{d}{2} = \frac{1,22 \cdot \lambda}{2 \cdot N.A.} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

La penetración del láser en la muestra (h) está definida por la longitud de onda de excitación (λ), el índice de refracción del medio (n) y la apertura numérica del objetivo (N.A.) como indica la Ecuación 2.3.

$$h = n \cdot \frac{\lambda}{(N.A.)^2} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

La Tabla 2.1 nos muestra los valores de diámetro del láser, área del spot, resolución espacial y penetración para las diferentes longitudes de onda de excitación y objetivos utilizadas en el desarrollo de esta tesis. Asimismo, se muestran las aperturas numéricas y la distancia de trabajo óptima para cada uno de los objetivos. En el cálculo de la

⁴ El disco de Airy es un fenómeno óptico debido a la naturaleza ondulatoria de la luz. Cuando ésta atraviesa una apertura circular se difracta produciendo un patrón de interferencia de regiones iluminadas y oscuras sobre una pantalla alejada de la apertura. El patrón de difracción resultante en una apertura circular iluminada uniformemente tiene una región central brillante conocida disco de Airy rodeada de una serie de anillos concéntricos denominados patrón de Airy.

penetración se ha considerado el índice de refracción del dióxido de silicio (SiO_2 , $n = 1,45$), sustrato más utilizado como soporte SERS en esta tesis.

Tabla 2.1 Diámetro, área del spot, resolución espacial y penetración del láser para las diferentes longitudes de onda de excitación y objetivos utilizadas en el desarrollo de esta tesis.

Objetivo	Apertura Numérica (N.A)	Distancia de trabajo (mm)	Diámetro spot laser (d , μm)	Área spot laser (μm^2)	Resolución espacial (r , μm)	Penetración (h , μm)
Láser 532 nm						
10x	0,2	14,30	3,25	8,27	1,62	19,29
20x	0,5	2,10	1,30	1,32	0,65	3,09
50x	0,8	0,57	0,81	0,52	0,41	1,21
100x	0,9	0,28	0,72	0,41	0,36	0,95
Láser 633 nm						
10x	0,2	14,30	3,86	11,71	1,93	22,95
20x	0,5	2,10	1,54	1,87	0,77	3,67
50x	0,8	0,57	0,97	0,73	0,48	1,43
100x	0,9	0,28	0,86	0,58	0,43	1,13
Láser 785 nm						
10x	0,2	14,30	4,79	18,01	2,39	28,46
20x	0,5	2,10	1,92	2,88	0,96	4,55
50x	0,8	0,57	1,20	1,13	0,60	1,78
100x	0,9	0,28	1,06	0,89	0,53	1,41

Estas resoluciones espaciales junto con la de alta eficiencia del detector Raman y la alta resolución confocal del microscopio permiten realizar áreas x - y - z con una alta precisión lo que permite aumentar el número de espectros por área obteniéndose resultados más robustos.

Para todos los sustratos SERS estudiados se optimizaron los **parámetros del equipo** que se enumeran a continuación. El objetivo es maximizar la amplificación de la señal Raman evitando la foto-descomposición de la muestra.

- Longitud de onda de excitación, estrechamente ligada a la aplicación final. En general, la longitud de onda de excitación tiene que ser lo más cercana al máximo de absorción del plasmón de resonancia de superficie (SPR de sus siglas en inglés, *Surface Plasmon Resonance*) del sustrato SERS. Pero en nuestro caso, los analitos son moléculas pequeñas fácilmente fotodegradables. La fotodegradación puede producirse por un aumento de temperatura local originado por el campo

eléctrico amplificado cuando la longitud de onda de excitación coincide con el SPR del sustrato. La descomposición de la muestra proporciona la huella del carbono amorfo, una banda ancha entre 1300 y 1500 cm^{-1} . Cuando esto ocurre pasamos a utilizar longitudes de onda mayores, menos energéticas, para excitar la muestra, aunque esto suponga reducir la intensidad Raman ($I_{\text{Raman}} = 1/\lambda^4$). La longitud de onda más utilizada durante la tesis fue la línea láser de 785nm.

- Potencia del láser. Junto con la longitud de onda de excitación es el parámetro más importante. Una mayor potencia del láser proporciona una mayor intensidad Raman, pero altas potencias pueden descomponer la muestra. En general, siempre será menor a 3 mW; lo estándar es comenzar en 1 mW y ajustarla maximizando la señal de la molécula.
- Objetivo del microscopio. Para una misma potencia láser disminuir el objetivo reduce la dosis, evitando problemas de descomposición de la muestra. La dosis se define como la potencia laser/superficie irradiada ($\text{mW}/\mu\text{m}^2$). Por otro lado, objetivos de menor magnificación tienen un mayor volumen de interacción con la muestra (penetración) lo que en sustratos rugosos permite hacer áreas sin acabar de perderse la altura focal. Los objetivos más utilizados durante la tesis fueron 20x y 50x.
- Tiempo de adquisición es proporcional a la intensidad Raman. Uno de los requerimientos de nuestra aplicación es una respuesta rápida, por lo que se fijó el tiempo de adquisición en el mínimo que nos proporcionará un espectro claro de la molécula analizada. En general, entre 0,1 s y 2 s; comenzando la optimización con 1 s.
- Número de acumulaciones. Cada acumulación es un espectro con el tiempo de adquisición fijado, por lo tanto, un mayor número de acumulaciones se corresponde con un mayor número de espectros promediados, disminuyendo el ruido de fondo. El número de acumulaciones varió entre 1 y 10 acumulaciones.
- Horizontal shift. Se trata de un parámetro del detector y se define como la frecuencia con la que la cámara CCD vuelca información al detector. Mayor frecuencia de vuelco se traduce en menores señales Raman. Este parámetro se modificará solo cuando la optimización de los parámetros previos no evite la saturación de la señal. Por defecto se trabajará con 0,033 MHz de *horizontal shift*, cambiando a 0,05 MHz cuando sea estrictamente necesario.

Los espectros Raman obtenidos fueron tratados y analizados con el software WITec 2.10 y el análisis estadístico de las áreas mapeadas con el software WITec 1.60.

2.1.2 Equipo Raman portable

El equipo Raman portable BWTEK i-Raman pro system fue utilizado para conocer las capacidades de detección de los sustratos SERS con sistemas portables más cercanos a las futuras condiciones reales de campo. La Figura 2.2 muestra los principales componentes del equipo Raman portable BWTEK. Se trata de un equipo Raman modular, más sencillo y ligero (~3 kg), y acoplado a un detector CCD. La fuente de excitación es un láser de longitud de onda de 785 nm. El cabezal de salida o sonda está acoplado a una fibra óptica que actúa como fuente de iluminación de la muestra y colector de los fotones retrodispersados o señal Raman. El detector CCD se enfría hasta $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, mediante una placa Peltier, alcanzando una resolución espectral de 6 cm^{-1} .

Al carecer de microscopio para enfocar la muestra los únicos parámetros que podemos optimizar para maximizar la señal Raman son la potencia del láser, el tiempo de adquisición, y el número de acumulaciones. La máxima potencia del equipo son 350 mW y el diámetro del disco de Airy es de $100\text{ }\mu\text{m}$.



Figura 2.2 Equipo Raman portable BWTEK utilizado durante la caracterización de los sustratos SERS.

Los espectros Raman obtenidos fueron tratados y analizados con el software OriginPro 2018.

2.2 FACTOR DE AUMENTO ANALÍTICO (AEF)

Las propiedades SERS o de aumento del campo electromagnético, y por tanto, de aumento de la señal Raman de una molécula en un sustrato plasmónico pueden ser calculadas siguiendo diferentes metodologías [34]. Dependiendo del método elegido el factor de aumento puede variar hasta en un par de ordenes de magnitud. En el desarrollo de esta tesis hemos seleccionado el Factor de Aumento Analítico (AEF, de sus siglas en inglés, *Analytical Enhancement Factor*) para cuantificar el aumento del campo electromagnético, y poder así, intercomparar los diferentes sustratos SERS fabricados.

El AEF proporciona información sobre el aumento de la señal que un sustrato SERS produce en comparación con un experimento Raman de referencia, es decir, sin sustrato SERS, y se calcula siguiendo la siguiente ecuación (Ecuación 2.4):

$$AEF = \frac{\frac{I_{SERS}}{C_{SERS}}}{\frac{I_{Raman}}{C_{Raman}}} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

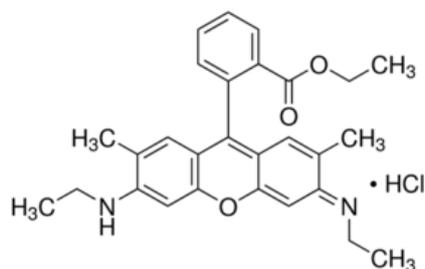
Donde I_{SERS} y C_{SERS} son la intensidad y la concentración de la molécula analiza cuando se mide sobre un sustrato SERS; e I_{Raman} y C_{Raman} son la intensidad y la concentración de la misma molécula medida en ausencia del sustrato SERS. Para poder comparar I_{SERS} con I_{Raman} la molécula analizada y las condiciones experimentales de medida deben ser casi idénticas. Debe mantenerse constante el detector, la longitud de onda de excitación, y objetivo, y puede modificarse la potencia y el tiempo de adquisición. En caso de variar estos parámetros la intensidad de la señal se debe normalizar por la potencia y el tiempo ($\text{cts mW}^{-1} \text{s}^{-1}$) para poder realizar la comparación.

En el Anexo II (pág. 257) aparece el protocolo de medida del AEF detallando el procedimiento experimental para realizar las medidas en condiciones Raman y condiciones SERS de la disolución de referencia. Así como, los espectros Raman promedio de referencia obtenidos para ambas moléculas y los diferentes láseres usados en el cálculo del AEF durante el desarrollo de esta tesis.

En general, las moléculas patrón en el cálculo del AEF son cromóforos o moléculas con anillos bencénicos. En esta tesis se ha utilizado rodamina 6G (R6G) y 4-nitrotiofenol (4-NBT, denominación común y extraída del inglés *4-nitrobenzenethiol*), la Figura 2.3

muestra la estructura química de ambas moléculas y la Tabla 2.2 sus principales propiedades y las de las disoluciones utilizadas en el cálculo del AEF.

(a) Rodamina 6G (R6G)



(b) 4-nitrotiofenol (4-NBT)

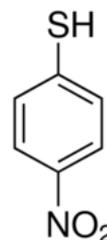


Figura 2.3 Estructura química de las moléculas de referencia (a) rodamina 6G, R6G, y (b) 4-nitrotiofenol, 4-NBT.

Tabla 2.2 Principales características de las moléculas de referencia y de sus disoluciones en el cálculo del AEF.

Molécula	Número CAS	Pureza	Peso Molecular (gr/mol)	Concentración en medida Raman (C_{Raman})	Concentración en medida SERS (C_{SERS})	Pico monitorizado
Rodamina 6G (R6G)	989-38-8	99%	479,01	1×10^{-3} mol/L (agua destilada)	1×10^{-6} (agua destilada)	1512 cm^{-1} (C-C stretching)
4-nitrotiofenol (4-NBT)	1849-36-1	100%	155,17	9×10^{-3} mol/L (etanol absoluto)	1×10^{-6} (etanol absoluto)	1338 cm^{-1} (NO_2 stretching)

Antes de comenzar con las medidas de AEF, se caracterizó la huella dactilar de ambos compuestos puros. La R6G es un sólido rosa y 4-NBT un sólido amarillo. La Figura 2.4 muestra el espectro Raman de ambas moléculas.

La molécula de R6G posee múltiples modos activos en Raman en el rango de 500 a 1700 cm^{-1} (Figura 2.4a). Las bandas desplazadas a 1645, 1589, 1513 y 1360 cm^{-1} corresponden al modo vibracional C-C stretching, 1567 cm^{-1} al C=C stretching, 1177 y 767 cm^{-1} al bending de los C-H aromáticos y 610 cm^{-1} al bending del anillo aromático [304]. El pico utilizado para monitorizar R6G y calcular el AEF es el pico desplazado a 1513 cm^{-1} .

Por su parte, la molécula de 4-NBT tiene siete modos activos en el mismo rango, 500 a 1700 cm^{-1} (Figura 2.4b). Los picos desplazados a 1181, 1099, 855 y 625 cm^{-1} se corresponden con modos vibracionales del enlace C-H, 1575 cm^{-1} al stretching de los

enlaces C-C y 727 cm^{-1} al enlace C-S [305]. Por último, el pico a 1333 cm^{-1} se corresponde al *stretching* simétrico del enlace de NO_2 , y será su intensidad la utilizada para calcular el AEF.

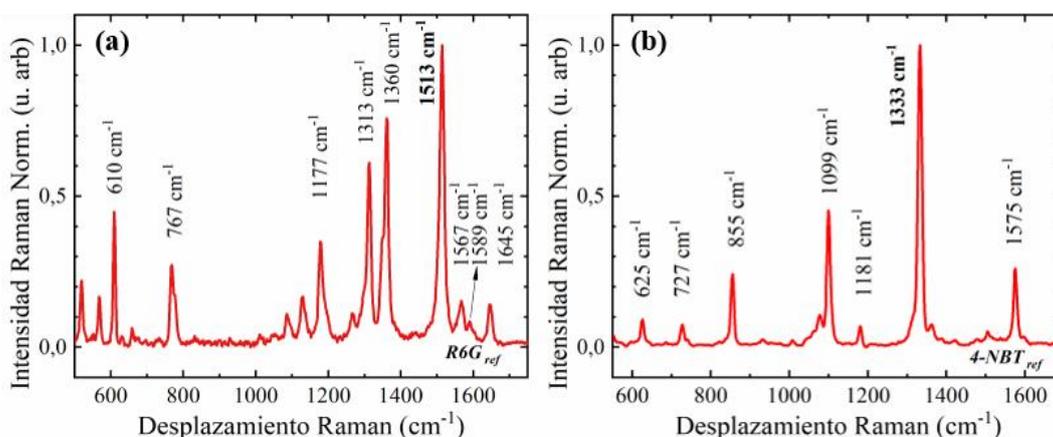


Figura 2.4 Espectro Raman de las moléculas de referencia R6G (a) y 4-NBT (b). En negrita las bandas utilizadas para calcular el AEF con cada una de las dos moléculas patrón.

2.3 DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS

Esta tesis se ha desarrollado principalmente usando como molécula diana metilfosfonato de dimetilo, DMMP, simulante del agente neurotóxico gas Sarín y a su vez de toda la serie G de agentes neurotóxicos. El 2-cloroetilsulfuro (CEES, de sus siglas en inglés *2-chloroethyl ethyl sulfide*), simulante del gas lacrimógeno Mostaza, fue utilizado para comprobar las capacidades de detección de los sustratos SERS frente a otras armas químicas no organofosforadas.

2.3.1 Analitos de detección, toxicidad y medidas de seguridad

Las principales propiedades fisicoquímicas de ambas moléculas aparecen en la Tabla 2.3. Ambos compuestos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y son líquidos a temperatura ambiente.

Tabla 2.3 Propiedades fisicoquímicas del DMMP y CEES.

Compuesto	Número CAS	Pureza	Peso Molecular (gr/mol)	Densidad (gr/mL)	Punto fusión (°C)	Punto ebullición (°C)	Presión de vapor (Pa) a 20 °C
DMMP	756-79-6	97%	124,08	1,145	-50	181	75
CEES	693-07-2	100%	124,63	1,07	-48,6	156	453

La manipulación de ambos compuestos debe realizarse bajo unas estrictas medidas de seguridad debido a su alta toxicidad (ver Tabla 2.4). Debe usarse bata, máscara de gases (FFABEKIP3-D12 EN 405:2001 de SPERIAN), doble par de guantes siendo el exterior de caucho nitrilo con un grosor de 0,11 mm, y gafas de seguridad. Los residuos y todo material que haya estado en contacto con estos compuestos o con sus diluciones será tratado como residuo tóxico. Se guardará dentro de bolsas de plástico herméticas dentro de una campana de extracción hasta la evaporación de los posibles disolventes, para después ser gestionados como residuo sólido. En caso de verter una disolución pondremos papel absorbente dentro de la bolsa de plástico.

Tabla 2.4 Clasificación de la toxicidad del DMMP y CEES de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 [306].

Categoría de clasificación	Vía de exposición	Palabra de advertencia	Código	Indicación de peligro
DMMP				
Categoría 1B		Peligro	H340	Puede provocar defectos genéticos
Categoría 2		Atención	H361f	Se sospecha que perjudica a la fertilidad
Categoría 2	Ocular	Atención	H319	Provoca irritación ocular grave
CEES				
Categoría 1A		Peligro	H350	Puede provocar cancer
Categoría 1B	Cutánea	Peligro	H314	Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
Categoría 3	Inhalación	Peligro	H331	Tóxico en caso de inhalación
Categoría 3	Cutánea	Peligro	H311	Tóxico en caso de contacto con la piel
Categoría 3	Oral	Peligro	H301	Tóxico en caso de ingestión

2.3.2 Caracterización de la huella espectral de DMMP y CEES en fase líquida

En primer lugar, se caracterizó la huella espectral de ambas moléculas midiéndolas en fase líquida. Para ella se colocó una gota de 2 μL del agente simulante sobre un soporte de SiO_2 y se siguió el mismo procedimiento que para medir la disolución de referencia en condiciones Raman (Anexo II-a, pág. 257).

La Figura 2.5b muestra el espectro Raman y la estructura química de la molécula de DMMP. Asimismo, en la Tabla 2.5 aparece la asignación completa de bandas de la molécula de DMMP medida en fase líquida. El espectro de DMMP tiene 12 picos característicos entre 400 y 1500 cm^{-1} . La señal más intensa aparece a 718 cm^{-1} y se corresponde con el modo vibracional P-CH₃ *stretching* (banda c de la Figura 2.5 y Tabla 2.5) que será la utilizada para monitorizar la detección de DMMP.

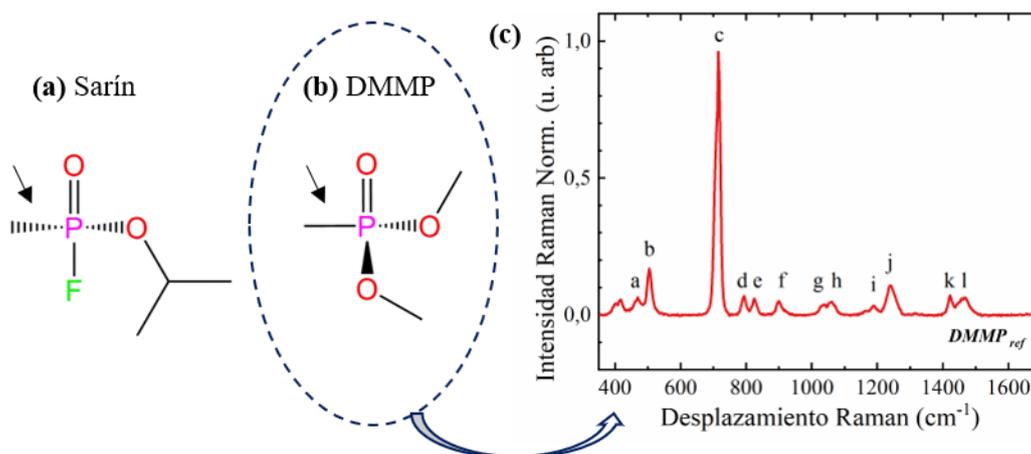


Figura 2.5 Estructura química de las moléculas de gas sarín (a) y DMMP (b). (c) Espectro Raman de la molécula de DMMP medida en fase líquida. Condiciones experimentales de medida: equipo Alpha 300; laser 785nm; objetivo 50x; potencia 10 mW y 10s. Las flechas en (a) señalan el pico más intenso de (b), banda c.

Tabla 2.5 Asignación de bandas de la molécula de DMMP [307].

Banda	Desplazamiento Raman (cm^{-1})	Asignación
a	466	POCH_3 bending
b	504	PO_3 bending
c	718	P-CH₃ stretching
d	794	PO_2 bending
e	825	PO_2 bending
f	903	CH_3O rocking
g	1039	C-O stretching
h	1062	C-O stretching
i	1183	CH_3 bending
j	1240	P=O stretching; CH_3 bending
k	1419	CH_3 bending
l	1424	CH_3P bending

Por otra parte, la Figura 2.6 muestra la estructura química de las moléculas de gas mostaza y de su simulante, CEES. El espectro Raman y la asignación de bandas de la molécula de CEES medida en fase líquida aparecen en la Figura 2.6c y Tabla 2.6. El espectro muestra tres picos principales entre 400 y 1100 cm^{-1} . El pico más intenso se corresponde con el C-S stretching y está desplazado a 690 cm^{-1} (banda b del espectro).

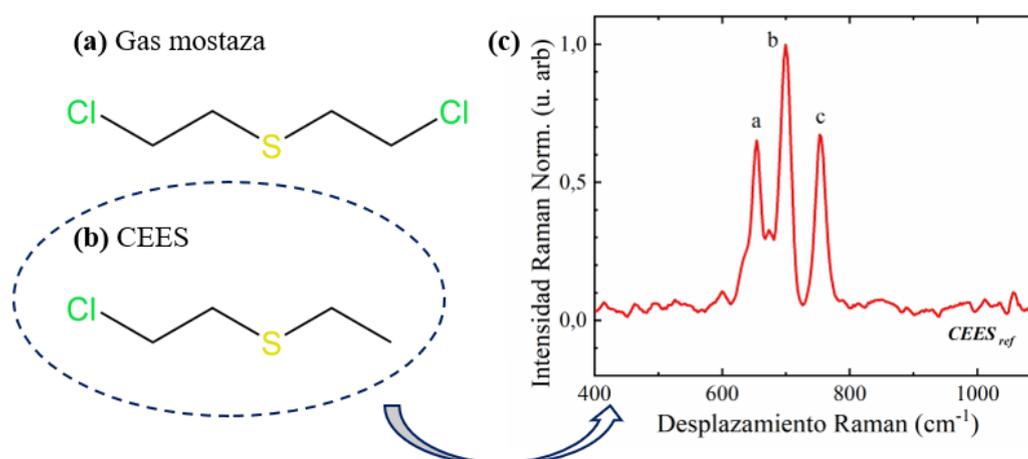


Figura 2.6 Estructura química de las moléculas de gas mostaza (a) y CEES (b). (c) Espectro Raman de la molécula de CEES medida en fase líquida. Condiciones experimentales de medida: Raman portable BWTEK; láser 785nm; 350m mW; 10s.

Tabla 2.6 Asignación de bandas de la molécula de CEES [308].

Banda	Desplazamiento Raman (cm^{-1})	Asignación
a	650	C-S <i>bending</i> ; C-S-C <i>stretching</i>
b	690	C-S <i>stretching</i>
c	750	C-Cl <i>stretching</i>

2.3.3 Celda de gases

La celda de gases fue diseñada *ad hoc* y consta de tres piezas: la base, la cubierta y el calce (ver Figura 2.7a y b). Las dimensiones totales son de 70×60×10 mm y una vez cerrada tiene un volumen interno de $2,7 \times 10^{-2} \text{ cm}^3$. La parte central de la cubierta tiene una apertura de 20 mm de diámetro que actúa como ventana óptica para enfocar el microscopio óptico del equipo Raman. La apertura se cierra con un cubre de pyrex de 150 μm de espesor. El cubre de pyrex se pega a la tapa de aluminio mediante el adhesivo epoxi de dos componentes Araldite® de la marca Ceys. El calce se coloca dentro de la base y sobre él se coloca el sustrato SERS. El calce permite acercar el sustrato a la ventana óptica y entrar dentro de la distancia focal del objetivo, el sustrato quedara a una distancia de alrededor 150 μm de la ventana óptica. La celda de gases trabaja en flujo continuo de gas con una entrada y una salida enfrentada. La entrada del gas se realiza rasante al sustrato SERS, de este modo se minimiza el volumen muerto (ver Figura 2.7c). La estanqueidad de la celda se consigue mediante una junta tórica alojada en una hendidura de la base y la celda se cierra con tornillos M5. Los planos detallados de la celda aparecen en el Anexo III.

La celda de gases de gases se fabricó en aluminio en el Servicio de Mecánica de Precisión de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza. Para las entradas y salidas de la celda, se utilizaron racores de acero con férula plana. Las tuberías de entrada fueron de acero con 1/16" de diámetro externo y las de salida de Teflón (politetrafluoroetileno) 1/8" de diámetro externo. Para las ramificaciones aguas abajo de la celda se emplearon tuberías de acero y aguas arriba de Teflón.

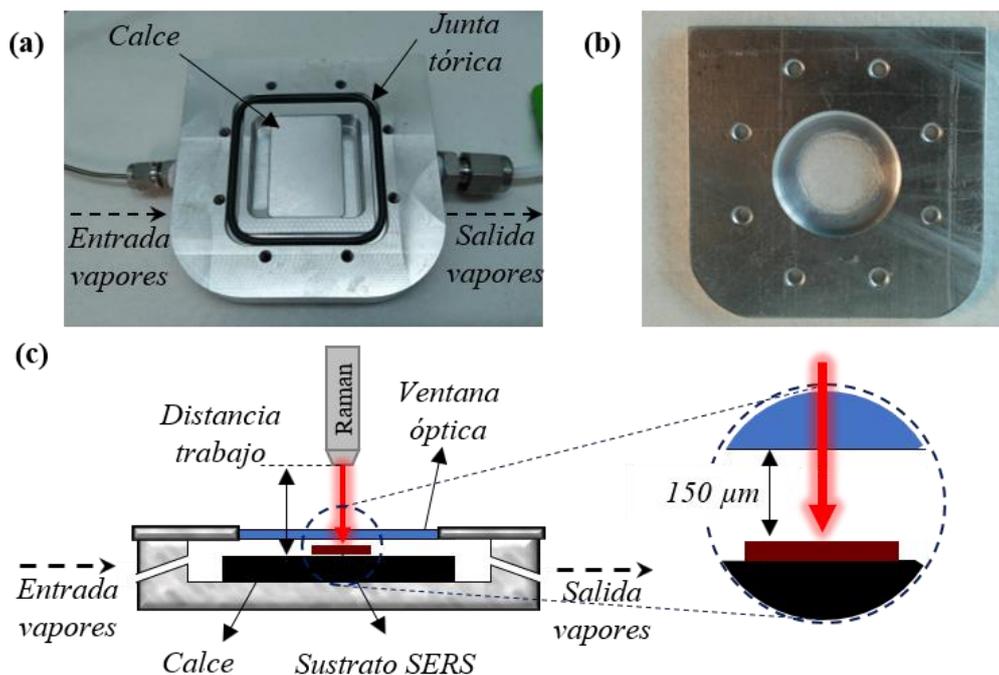


Figura 2.7 (a) Celda de gases donde se coloca el sustrato SERS durante la detección de agentes neurotóxicos en fase gas. (b) Cubierta de la celda de gases. (c) Esquema transversal de la celda de gases.

Dependiendo de la molécula y la concentración de esta el sistema experimental de generación de vapores y alimentación de los mismo a la celda puede modificarse ligeramente. A continuación, se muestran las configuraciones usadas en el desarrollo de esta tesis.

2.3.4 Generación de vapores de DMMP, simulante del gas Sarín

2.3.4.1 Tubo de permeación

Los sistemas de permeación son un excelente método de generación de vapores de concentración conocida en el rango de ppm (partes-por-millón) y ppb (partes-por-billón). Conocida la permeación a través de la membrana, certificada por el proveedor, para unas condiciones de caudal y temperatura constante, la concentración de la corriente de salida puede ser calculada. En el desarrollo de esta tesis se ha trabajado con un tubo de permeación tubular diámetro y longitud 10 mm de VICI (ref. MT-PD-Experimental 107-100-7845-HE3-C50, ver Figura 2.8a) a una temperatura de 80°C y un caudal de arrastre de 10 mL/min . En estas condiciones el caudal de permeación v es de $126,78 \pm 4,81\text{ ng/min}$, alcanzándose una concentración de DMMP en la corriente de salida de $2,5\text{ ppmV}$.

La concentración se calcula mediante la siguiente ecuación (Ecuación 2.5):

$$C = \frac{v \times \left(\frac{24,46}{PM}\right)}{F_c} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Donde C es la concentración expresada en ppmV, v es la velocidad de permeación en ng/min, PM es el peso molecular del DMMP (124,48 gr/mol) y F_c el caudal del gas de arrastre (mL/min). En el cálculo se consideraron una 1 atm de presión y 25°C. Para evitar problemas de sobrepresión en la celda de gases el caudal de arrastre se fijó en 10 mL/min.

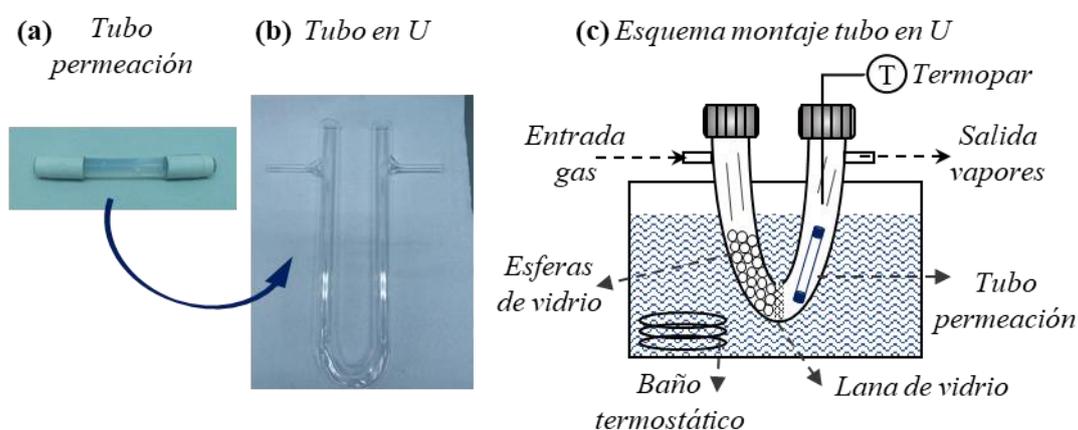


Figura 2.8 (a) Tubo de permeación, (b) tubo en U. (c) Esquema de montaje del tubo de permeación dentro del tubo en “U”.

Para alcanzar y mantener el tubo de permeación a 80°C, este se colocó en un tubo en U ($\phi = 19$ mm) de vidrio dentro de un baño termostático (Figura 2.8b y c). A la entrada del tubo en U se colocaron bolas de vidrio para precalentar el caudal de aire de entrada antes de que alcance el tubo de permeación colocado en la salida. Se colocó un termopar dentro del tubo en U. Antes de comenzar a usarse, el sistema tiene que alcanzar un estado estacionario. El sistema se estabiliza transcurridas 2 h en las condiciones fijadas de temperatura y caudal.

Dependiendo del gas de arrastre, N_2 o aire del laboratorio, el sistema experimental cambia ligeramente, siendo la principal diferencia el mecanismo de impulso del gas. Cuando usamos N_2 es la sobrepresión de la botella la impulsora del gas (ver Figura 2.9). Por el contrario, cuando usamos aire del laboratorio colocamos una microbomba de succión aguas arriba de la celda de gases para arrastrar los vapores del DMMP hasta esta (ver Figura 2.10). Ambos sistemas tienen un medidor de caudal a la salida para confirmar

el caudal constante de 10 mL/min y detectar posibles fugas. Existe un *bypass* (V2) que se utiliza durante los 20 min previos a comenzar el experimento para estabilizar la concentración y el caudal., y siempre que el tubo de permeación esté en funcionamiento y no queramos que los gases pasen por la celda. Los gases de salida se ventean al exterior. Los espectros Raman comienzan a recogerse desde que se abre la válvula de paso (V2) hacia la celda de gases y manteniendo V3 cerrada, ver Figura 2.9 y Figura 2.10.

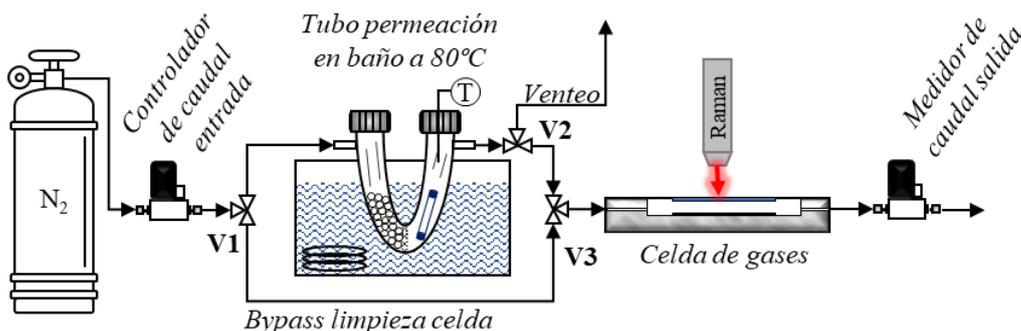


Figura 2.9 Sistema experimental de generación de vapores de DMMP arrastrados por una corriente de N₂

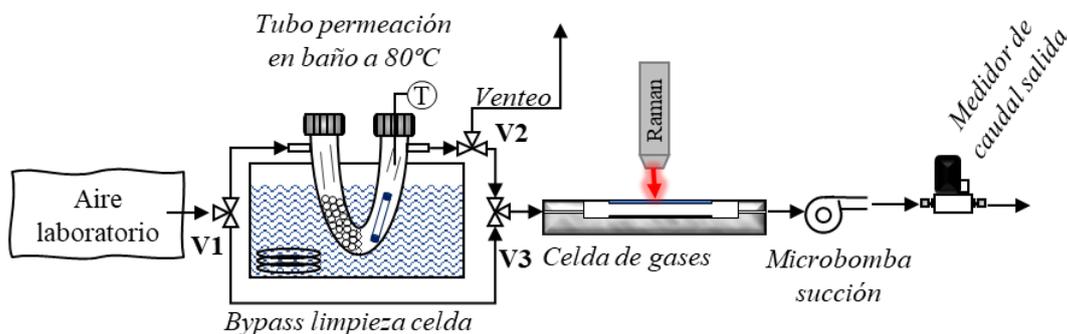


Figura 2.10 Sistema experimental de generación de vapores de DMMP arrastrados por una corriente de aire succionada del laboratorio

2.3.4.2 Bolsas de gases

Los vapores de DMMP de concentración menor a 2,5 ppmV se generaron utilizando bolsas de gases. Las bolsas de gases o Tedlar® *bags* con bajas concentraciones de DMMP se preparan a partir de una bolsa “madre” o *stock* de mayor concentración mediante un sistema de dilución secuencial.

En primer lugar, la bolsa de gases se llena con N₂ utilizando el sistema experimental mostrado en la Figura 2.11a. Para llenar bolsas de 10 L se utilizó un medidor de caudal

de 100 mL/min, y para llenar bolsas de 1 L un medidor de 10 mL/min, controlando el tiempo de llenado con un cronómetro.

La bolsa “madre” se prepara inyectando DMMP líquido con una jeringuilla Hamilton® de líquidos a través del septum dentro de la bolsa. La concentración se calcula como muestra la siguiente expresión (Ecuación 2.6).

$$C \text{ (ppmV)} \cdot V_{bolsa} \text{ (L)} \cdot \frac{P}{R \cdot T} \cdot PM_{DMMP} \cdot \frac{1}{\rho_{DMMP}} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Donde, C es la concentración final de la bolsa en ppmV; V es el volumen total de N_2 en la bolsa expresado en litros (L); P es la presión atmosférica (1 atm); R la constante de los gases ideales; T la temperatura (25 °C); PM es el peso molecular del DMMP (124,08 g/mol) y ρ es la densidad del DMMP (1.145 g/mL). Así, por ejemplo, para conseguir una concentración de 9 ppmV tenemos que inyectar un volumen de 0,4 μ L de DMMP en una bolsa en la que se introducen 10 L de N_2 con un medido de flujo másico.

Tras un periodo de estabilización de 12 h, la bolsa diluida de DMMP se preparará extrayendo la cantidad necesaria de gas con una jeringuilla de gases Hamilton® (Figura 2.11b); e inyectándolo en una bolsa de gases de 1 L. El volumen de N_2 se ajustará dependiendo del volumen de gas trasferido de la bolsa “madre”. La dilución podrá ser usada en 12-24 h. La Figura 2.11b muestra un esquema de la preparación de la bolsa “madre” y de su posterior dilución.

El sistema experimental de alimentación de la bolsa a la celda de gases se muestra en la Figura 2.11c. Los vapores de DMMP son succionados por una microbomba colocada aguas arriba de la celda y manteniendo un caudal de arrastre de 10 mL/min. Los espectros Raman comienzan a recogerse desde el momento en que la microbomba empieza a succionar el DMMP de la bolsa.

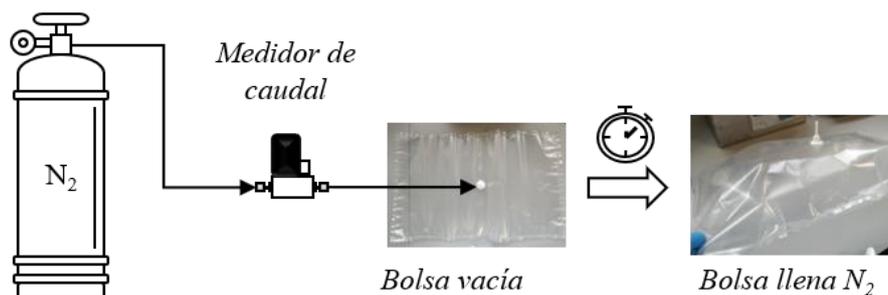
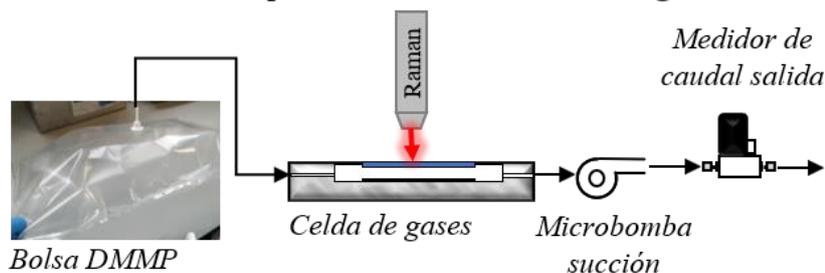
(a) Llenado de la bolsa de gases con N_2 **(b) Inyección de DMMP líquido en la bolsa madre y dilución****(c) Alimentación de los vapores de la bolsa a la celda de gases**

Figura 2.11 (a) Sistema experimental de llenado de una bolsa de gases con N_2 . (b) Esquema de la inyección del DMMP líquido en la bolsa de gases y dilución. (c) Sistema experimental de succión de los vapores de DMMP ($< 2,5$ ppmV) de la bolsa de gases a la celda de gases.

2.3.5 Generación de vapores de CEES, simulante del gas mostaza

Los vapores de CEES se generaron usando un capilar de difusión. Estos son otro método de generación de vapores de concentración conocida en el rango de los ppms y ppbs (Figura 2.12). En este caso, el compuesto líquido se coloca en el reservorio del capilar a temperatura constante, y es la presión de vapor la que ejerce una fuerza constante permitiendo la difusión de gas a través del capilar del tubo (ver Figura 2.12b).

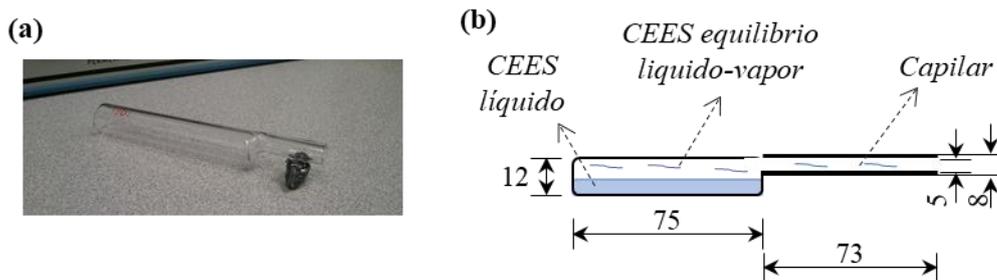


Figura 2.12 (a) Ejemplo de capilar de difusión. (b) Esquema del capilar de difusión usado en esta tesis con sus dimensiones (expresado en milímetros, mm).

El sistema experimental de generación de vapores de CEES sigue el mismo esquema que el usado en la generación de vapores de DMMP arrastrados por N_2 (ver Figura 2.9, pág. 59) pero sustituyendo el tubo de permeación por el capilar de difusión dentro del tubo en U. El caudal de arrastre de N_2 se mantiene constante en 10 mL/min y la temperatura del baño baja a 20 °C.

El caudal de difusión del CEES v (ng/min) a través del capilar se calcula según la Ecuación 2.7.

$$v = 1,90 \times 10^4 \cdot T \cdot D_0 \cdot PM \cdot \frac{A}{L} \cdot \log \frac{P}{P - P_{CEES}} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

Donde T es temperatura del vapor, 293 K (20 °C); D_0 , coeficiente de difusión, $1,07 \times 10^{-4}$ cm²/sec [309]; PM , peso molecular del CEES (124,63 g/mol); A , área transversal del capilar, 0,19 cm²; L , longitud del capilar, 7,3 mm; P , presión atmosférica, 760 mmHg; y, P_{CEES} presión de vapor del CEES a temperatura T (3,4 mmHg).

La concentración final del CEES se calcula mediante la Ecuación 2.5 (pag. 58), que al igual que en caso del DMMP depende del caudal del gas de arrastre, el peso molecular del CEES y la velocidad de difusión de este.

Para unas condiciones de presión y temperatura (20 °C) y con un caudal de N_2 de 10 mL/min el caudal de difusión del CEES es de 3,9 ng/min, y, por tanto, la concentración alimentada a la celda de gases es de 76 ppbV.

El sistema tiene un período de estabilización de 36 h, tras las cuales puede comenzar a usarse. El tubo en U y la celda de gases, así como todas las tuberías, fueron diferentes a las utilizadas en los experimentos con DMMP.

2.4 DETECCIÓN DE PESTICIDAS EN FASE LÍQUIDA

En el caso de la detección de pesticidas en fase líquida se seleccionó el paraoxon-metil como molécula diana, en adelante paraoxon. El paraoxon se encuentra dentro del grupo de los pesticidas organofosforados, siendo además un metabolito activo del insecticida paratión.

La Figura 2.13a muestra la estructura y la Tabla 2.7 las principales propiedades fisicoquímicas de la molécula paraoxon. El paraoxon es un líquido viscoso a temperatura ambiente. Los valores de temperatura de fusión y ebullición, así como la densidad, no se encontraron tabulados en literatura.

Al igual que el DMMP y CEES, el paraoxon es una molécula con una alta toxicidad (ver Tabla 2.8) por lo que su manipulación debe realizarse con doble par de guantes y el exterior de caucho nitrilo de 0,11 mm, máscara de gases y gafas de seguridad. Sus residuos, así como todo material en contacto con este, se tratarán como residuos tóxicos y se gestionarán como residuo sólido.

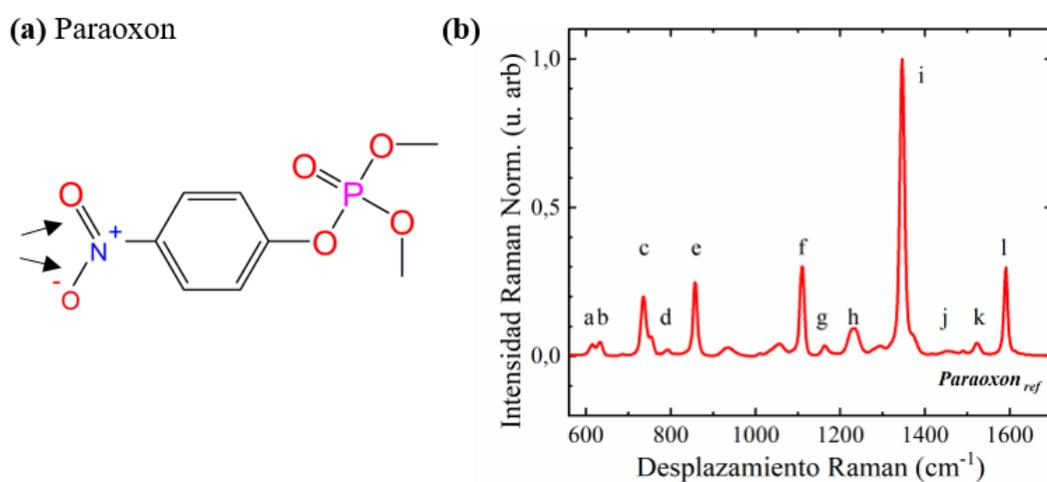


Figura 2.13 (a) Estructura química de la molécula paraoxon. (b) Espectro Raman de la molécula de paraoxon medida en fase líquida. Condiciones experimentales de medida: equipo Alpha 300; laser 785nm; objetivo 20x; potencia 85 mW y 5 s. Las flechas en (a) señalan el pico más intenso de (b), banda i.

Tabla 2.7 Principales propiedades fisicoquímicas del paraoxon

Compuesto	Número CAS	Pureza	Peso Molecular (gr/mol)	Densidad (gr/mL)	Punto fusión (°C)	Punto ebullición (°C)	Presión de vapor (Pa) a 20 °C
Paraoxon-metil (paraoxon)	950-35-6	100%	247,14	N.D.	N.D.	N.D.	170

N.D.: Información no disponible

Tabla 2.8 Clasificación de la toxicidad del paraoxon de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 [306].

Categoría de clasificación	Vía de exposición	Palabra de advertencia	Código	Indicación de peligro
Paraoxon-metil				
Categoría 2	Oral	Peligro	H300	Mortal en caso de ingestión

En primer lugar, se caracterizó la huella dactilar del compuesto puro. La molécula de paraoxon posee 12 modos activos en Raman entre 600 y 1700 cm^{-1} (Figura 2.13). El más intenso, desplazado a 1348 cm^{-1} y correspondiente a la banda NO_2 , fue seleccionado para monitorizar la detección de paraoxon. La asignación completa de las bandas de paraoxon aparece en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9 Asignación de bandas de la molécula de paraoxon [310]

Banda	Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	Asignación
a	619	Movimiento del anillo fuera del plano
b	631	NO ₂ <i>scissor</i> y C-C <i>bending</i>
c	734	NO ₂ <i>scissor</i> y C-C <i>bending</i>
d	794	<i>Ring breath</i>
e	856	NO ₂ <i>scissor</i>
f	1110	C-H <i>bend</i> y NO ₂ <i>asymmetric stretch</i>
g	1163	C-H <i>bend</i> (in plane)/NO ₂ <i>asymmetric stretch</i> , vibración en plano de para-nitrofenol
h	1228	P=O <i>stretching</i>
i	1348	NO₂ <i>symmetric stretching</i>
j	1448	Deformación del anillo
k	1524	NO ₂ <i>unsymmetric stretching</i>
l	1590	Vibración del anillo

La detección de paraoxon se realizó en fase líquida, para ello se prepararon diferentes diluciones de paraoxon partiendo de una disolución “madre” o *stock* que se realizó pesando el paraoxon. La disolución *stock* 1 mM y las consecutivas diluciones se prepararon en etanol absoluto. En el desarrollo de esta tesis hemos desarrollado dos tipos de detección dependiendo del tipo de sustrato SERS: detección en estático y detección en continuo, ambas se describen a continuación.

2.4.1 Detección en estático

La detección de paraoxon en estático se realizó incubando los sustratos SERS en disoluciones de concentración conocidas de paraoxon, y midiendo la huella espectral una vez seco el sustrato SERS.

Los sustratos SERS se incubaron en 25 mL de cada una de las diferentes diluciones de paraoxon durante 40 minutos, en posición vertical. Se dejaron secar durante 30 minutos y se llevaron al equipo Raman Alpha 300 para caracterizar las capacidades de detección de paraoxon de los sustratos SERS.

2.4.2 Detección en continuo

La detección de paraoxon en continuo se realizó haciendo pasar las disoluciones de concentración conocida de paraoxon por los microdispositivos SERS impulsadas por una bomba de jeringa. En este caso las diluciones se prepararon en agua destilada. La fabricación de los microdispositivos SERS aparece en el Capítulo 4.

El microdispositivo se sitúa bajo el microscopio del equipo Alpha 300 de sobremesa como se muestra en la Figura 2.14 y la disolución de paraoxon es alimentada de manera continua con una bomba de jeringa (Standard Infusion Only PHD Ultra de Harvard Apparatus) y un caudal constante de 0,5 mL/min.

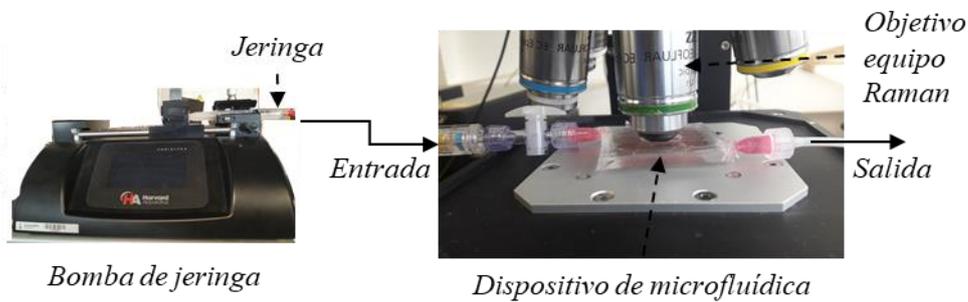


Figura 2.14 Sistema experimental de detección de paraoxon en flujo continuo

Capítulo III

NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS

Resumen

En este capítulo sintetizamos y depositamos nanotriángulos de plata sobre tres sustratos diferentes: una oblea de SiO₂/Si, una malla de acero inoxidable y una plancha de grafito. El AEF se calculó con la molécula patrón R6G y tres longitudes de onda de excitación 532, 633 y 785 nm. Los mejores resultados los ofreció el sustrato SERS de grafito con el láser de 785 nm, por eso fue seleccionado para la detección de DMMP en fase gas a una concentración de 2,5 ppmV con el equipo Raman portable. La interacción entre la molécula de DMMP y la plata fue estudiada mediante cálculos computacionales basados en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).

El contenido de este capítulo ha sido adaptado de la siguiente publicación científica:

M. Lafuente, D. Sanz, M.A. Urbiztondo, J. Santamaría, M.P. Pina, R. Mallada.

“Gas phase detection of chemical warfare agents CWAs with portable Raman”

Journal of Hazardous Materials, **2020**, 384, 121279. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121279

3 NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS

3.1 INTRODUCCIÓN

Cómo se ha comentado en la introducción, el efecto SERS depende de la sección transversal de la molécula analito [28,29]. En nuestro caso, la cross-section de los agentes neurotóxicos, y en general, de las armas químicas, es pequeña, en el rango de 10^{-29} $\text{cm}^2 \text{sr}^{-1} \text{molecule}^{-1}$ [311], en comparación con las de los colorantes, alrededor de 10^{-24} - 10^{-23} $\text{cm}^2 \text{sr}^{-1} \text{molecule}^{-1}$ para algunas longitudes de onda [29]. Esto implica que para poder detectarlos a bajas concentraciones con la tecnología SERS es necesario diseñar sustratos capaces de originar una gran amplificación del campo eléctrico y la señal Raman.

Estudios teóricos y experimentales han demostrado que las propiedades plasmónicas de los sustratos SERS son altamente dependientes de la distancia entre partículas, la forma y tamaño de la nanopartícula y las propiedades dieléctricas de la partícula, soporte y del medio que los rodea [312–315].

Los sistemas plasmónicos basados en una partícula o varias partículas metálicas sobre un soporte formado por una capa fina de metal han sido estudiados ampliamente, llegándose a entender el acoplamiento plasmónico entre las nanopartículas individuales y los plasmones de superficie propagantes sobre la capa fina metálica [168,313–318]. Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios sobre sistemas plasmónicos formados por recubrimientos con una alta densidad de nanopartículas sobre soportes metálicos o soportes no metálicos [319–322], donde el acoplamiento partícula-partícula y partícula-soporte puede afectar al plasmón de resonancia del sustrato SERS, la fluorescencia o la transferencia de calor, y, por tanto, al espectro y la intensidad SERS obtenida.

El plasmón de resonancia de sustratos SERS de alta densidad de nanopartículas puede verse modificado por un acoplamiento de la interacción dipolo-dipolo de nanopartículas contiguas con modos plasmónicos propagantes del sustrato metálico [319], por la distancia entre las nanopartículas y los film metálicos [320], al tamaño y espaciado entre nanopartículas [321] o al cambio de las propiedades dieléctricas del medio que rodea a las partículas [322]. Por otro lado, el acoplamiento entre las

nanopartículas y ciertos soportes puede producir transferencia de carga y energía, reduciendo la fluorescencia de la señal [323]. Parte de este capítulo está dedicada al estudio de la dependencia del plasmón de resonancia de los nanotriángulos de plata con el soporte del sustrato SERS: oblea de SiO₂/Si, mallas de acero inoxidable y planchas de grafito.

Se seleccionaron nanotriángulos de plata, Ag nPlates, como material plasmónico por cuatro razones relacionadas con la aplicación final como sensor SERS para la detección de DMMP en fase gas:

- i) Las propiedades ópticas de la plata. Una parte imaginaria de la función dieléctrica o permitividad pequeña que se traduce en un factor de calidad Q mayor, y que le permite tener un plasmón de superficie localizado en la región visible del espectro electromagnético [28].
- ii) La interacción específica entre la molécula de DMMP y la plata a través del grupo P-O [324].
- iii) La extraordinaria amplificación del campo electromagnético que se produce en las puntas y bordes de los nanotriángulos de plata [80,81].
- iv) La coincidencia del plasmón de superficie localizado de los Ag nPlates con la longitud de onda de excitación de 785 nm usada en las medidas con el equipo Raman portable.

3.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Materiales

Nitrato de plata (AgNO₃, 99,99999%), citrato de sodio tribásico dihidratado (>99%), peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 30%), bromuro de potasio (KBr, > 99%), borohidruro de sodio (NaBH₄, > 99%), cloruro de poli(alildimetilamonio) (PDDA, 20% en peso), rodamina 6G (R6G) y metilfosfonato de dimetilo (DMMP, 97%) se compraron en Sigma Aldrich y se usaron como se recibieron. Todas las disoluciones se prepararon con agua destilada. Las obleas de silicio con 1 μm de óxido de silicio térmicamente depositado (SiO₂/Si) se adquirieron en Sil'Tronix. Las planchas de grafito tipo RivaTherm-HD fueron suministradas por Kempchen.

3.2.2 Síntesis de nanotriángulos de plata (Ag nPlates)

La síntesis de los nanotriángulos de plata, en adelante Ag nPlates, fue optimizada por el Dr. Diego Sanz del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) basándose en protocolos previos [131]. Brevemente, en un vial de 20 mL y bajo agitación magnética se añaden las siguientes disoluciones acuosas: 8,5 mL de agua destilada; 3,75 mL de una disolución 0,5 mM de AgNO_3 ; 1 mL de citrato de sodio 25 mM; 28,2 μL de H_2O_2 y 10 μL de KBr. Por último, se añade el NaBH_4 (1,25 mL, 10 mM), encargado de reducir la plata. La disolución pasará de tener un color amarillo a azul en un par de minutos, indicando la formación del Ag nPlate. La disolución es centrifugada a 21000 rpm durante 20 min, y el sobrenadante se vuelve a centrifugar. Los precipitados se redispersan en agua destilada hasta alcanzar una concentración de 80 mg/mL y se añade citrato de sodio como estabilizante (concentración final 2,5 mM).

3.2.3 Preparación del sustrato SERS

Los sustratos SERS se prepararon sobre tres soportes diferentes: una oblea SiO_2/Si , una malla de acero inoxidable y grafito. Todos los soportes fueron cortados en piezas de alrededor de 4 mm \times 8 mm (ver Figura 3.1).

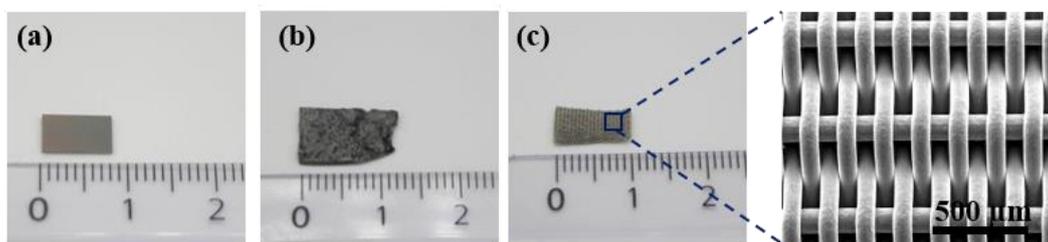


Figura 3.1 Imagen de los diferentes soportes usados como sustrato SERS: (a) oblea de SiO_2/Si ; (b) plancha de grafito y (c) malla de acero inoxidable. Se adjunta una magnificación de la malla de acero.

Antes de comenzar con el depósito de los Ag nPlates, los soportes fueron lavados durante 10 min, y de manera secuencial, con acetona, isopropanol y agua en un baño de ultrasonidos. A continuación, los sustratos se incubaron en posición vertical en una disolución de PDDA (0,2 % v/v) durante 4 h, tras las cuales se lavaron con abundante agua destilada y se secaron durante 10 min en un horno a 110 °C. Tras este tiempo, los sustratos se incubaron en la disolución de Ag nPlates durante 12 h y, finalmente, se dejaron secar en posición vertical a temperatura ambiente. La plancha de grafito antes de

ser incubada en PDDA se exfolió con un *scotch tape*. En adelante los sustratos SERS se denominarán Ag nPlates@SiO₂/Si, Ag nPlates@malla y Ag nPlates@grafito.

La descripción de los equipos y técnicas de caracterización se incluyen en el *Anexo I*. Se calculó el AEF de los tres sustratos SERS utilizando R6G como molécula patrón y los láseres de 532 nm, 633 nm y 785 nm del equipo Alpha 300 como fuentes de excitación y aplicando una dosis de irradiación de 0,13 mW/μm², 0,67 mW/μm² y 0,88 mW/μm², respectivamente. El tiempo de integración fue de 1 s y una acumulación en todos los casos. El protocolo de medida y cálculo del AEF aparece detallado en el apartado 2.2 (pág. 50), con la diferencia que en este capítulo se utilizó una concentración de R6G para las medidas SERS de 10 μM.

Los experimentos de detección de DMMP se realizaron en primer lugar con el equipo Alpha 300, y posteriormente, con el equipo Raman portable. Las condiciones de este último fueron una dosis de irradiación de 0,035 mW/μm², tiempo de adquisición de 1 s y 100 acumulaciones. Los vapores de DMMP se generaron usando un tubo de permeación calibrado (ver apartado 2.3.4.1, pág. 57) y se arrastraron con un caudal constante de N₂ de 10 mL/min hasta la celda de gases. El esquema detallado del sistema experimental aparece en la Figura 2.9, pág. 59.

3.2.4 Cálculos computacionales DFT

Los cálculos teóricos de interacción de los Ag nPlates con la molécula de DMMP fueron realizados por el **Dr. Miguel A. Urbizondo** del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA).

La geometría y las frecuencias vibracionales de la molécula de DMMP se calcularon usando métodos basados en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT, de sus siglas en inglés *density functional theory*). Y los cálculos se realizaron usando el software Gaussian 09 [325].

La optimización de la geometría del estado fundamental de la molécula de DMMP se realizó con el método DFT híbrido B3LPY [326,327] y el conjunto de funciones de base 6-311+ +G(d,p). Las moléculas de DMMP adsorbidas sobre la plata y los átomos de plata fueron calculados con el conjunto de funciones de base 6-311+ +G(d,p) y con el conjunto de bases LANL2DZ, respectivamente.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterización de los sustratos SERS

El rendimiento de la síntesis hacia la forma de nanotriángulos se calculó a partir de imágenes TEM de Ag nPlates recién sintetizados (ejemplo en Figura 3.2a). El rendimiento medio fue de un 85% de triángulos o *plates* de 38 ± 15 nm de lado ($N > 500$) y un 15% de nanopartículas esféricas.

El espectro de absorción de la suspensión Ag nPlates en función del tiempo de envejecimiento aparece representado en la Figura 3.2c. En todos los casos aparece un máximo de absorción en torno a 700 nm correspondiente a un modo plasmónico dipolar presente en las caras y las esquinas, con especial intensidad en estas últimas. Las bandas desplazadas a 460 nm y 331 nm corresponden a un modo plasmónico cuadripolar que aparece solo en las caras [328]. Podemos observar que el plasmón se desplaza hacia menores longitudes de onda, 640 nm, tras almacenarse los Ag nPlates durante un mes a temperatura ambiente y oscuridad. Esto se debe a que el LSPR es muy dependiente del tamaño y la forma de las nanopartículas metálicas, y, por tanto, esta evolución del LSPR puede deberse a una reorganización atómica de los Ag nPlates hacia una forma termodinámicamente más estable [329]. En nuestro caso puede estar debida a la pérdida de las puntas de los triángulos de los Ag nPlates (planos cristalográficos (110)) por la tendencia de la plata a la esfericidad o planos (111). La Figura 3.2a y b muestra imágenes TEM de los Ag nPlates recién preparados y tras 30 días donde puede observarse que transcurrido dicho tiempo los triángulos son más redondeados.

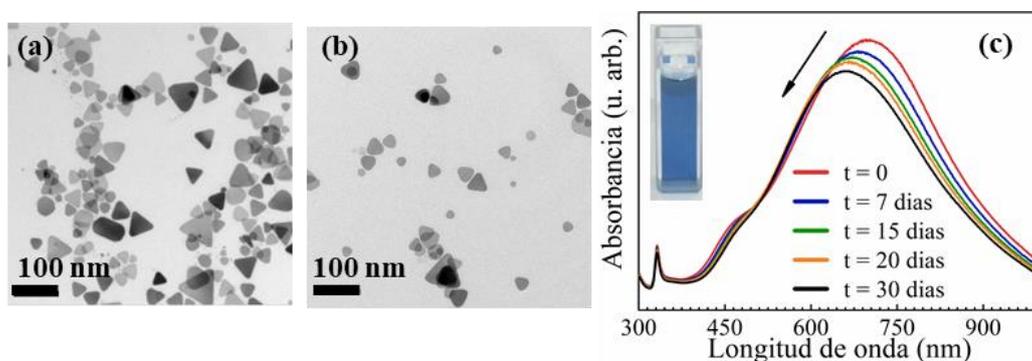


Figura 3.2 Imágenes TEM de los Ag nPlates recién sintetizados (a) y envejecidos 30 días (b). (c) Evolución del espectro de adsorción UV-Vis-NIR de la disolución de Ag nPlates con el tiempo. El inserto muestra una imagen real del color de la disolución.

Los recubrimientos de Ag nPlates se prepararon mediante la técnica de deposición de capa-sobre-capas (LbL, de sus siglas en inglés *Layer-by-Layer*) mediada por la interacción electrostática de capas de diferente carga (ver Anexo IV-a, pág. 264). Los soportes sólidos (SiO_2/Si , la malla de acero y el grafito) al igual que los Ag nPlates tienen una carga neta negativa por lo que se utilizó un polímero catiónico como intermediario entre ambos, cloruro de poli(alildimetilamonio) (PDDA). Los soportes se incuban en primer lugar en la disolución acuosa de PDDA y tras un intenso aclarado y secado se introducen en la suspensión de Ag nPlates. Si el soporte no se lava bien antes de introducirse en la suspensión de Ag nPlates, los restos de PDDA pueden desestabilizar la suspensión, aglomerando y precipitando los Ag nPlates.

Las imágenes SEM de la Figura 3.3 muestran una distribución homogénea de los Ag nPlates sobre los tres soportes y un porcentaje de recubrimiento prácticamente idéntico en los tres sustratos: $42 \pm 5\%$ para la oblea de SiO_2/Si , $41 \pm 5\%$ para la malla de acero y $44 \pm 3\%$ para el soporte de grafito. Estos valores nos indican la alta reproducibilidad de la técnica de deposición LbL mediada por PDDA para preparar recubrimientos SERS sobre diferentes materiales. En las imágenes SEM también se pueden observar zonas con una alta densidad de empaquetamiento de Ag nPlates. Esta alta densidad puede permitir el contacto entre Ag nPlates y acoplamiento de sus LSPR individuales, y por tanto, producirse un mayor aumento del campo electromagnético y de la señal Raman [168].

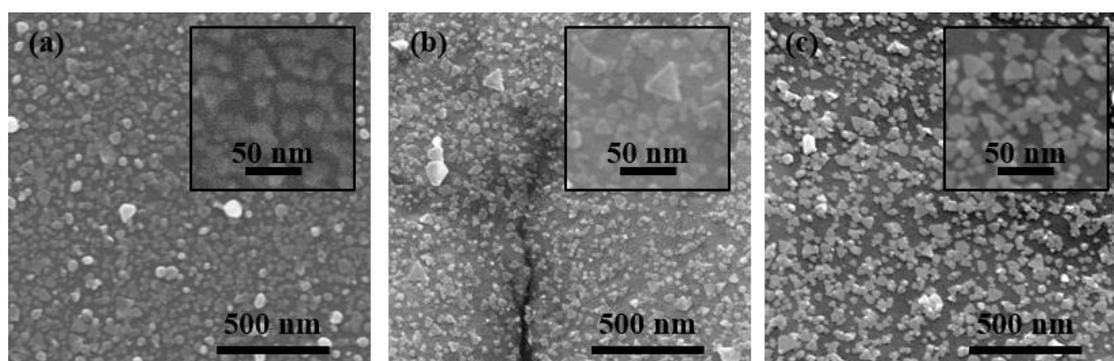


Figura 3.3 Imágenes SEM de los Ag nPlates depositados sobre los diferentes soportes SERS: (a) Si/SiO_2 ; (b) malla de acero y (c) plancha de grafito.

El espectro de absorción de los Ag nPlates depositados sobre pyrex (Figura 3.4a) presenta una resonancia del plasmón de superficie (SPR) más ancha y con el máximo desplazado hacia mayores longitudes de onda que el LSPR de los Ag nPlates en suspensión. Este desplazamiento puede deberse a diferentes causas entre ellas el cambio

de las propiedades dieléctricas del medio que rodea a los Ag nPlates, agua en las medidas en suspensión y aire en el sustrato SERS, el cambio de las propiedades dieléctricas de los soportes, o al acoplamiento del plasmón de partícula contiguas. La posición del máximo de absorción de está muy influenciada por el medio que rodea la partícula. Para las nanopartículas en una suspensión coloidal está reportado que al aumentar el índice de refracción del medio el plasmón se desplaza hacia los rojos o mayores longitudes de onda [322,330].

En el caso del sistema nanopartícula-soporte dieléctrico las propiedades plasmónicas se explican usando el concepto de hibridación del plasmón [88,312,331,332]. Este concepto nos dice que las cargas inducidas por la nanopartícula en el sustrato rompen la simetría del medio que rodea a la nanopartícula y, por tanto, el SPR se ve modificado. Se induce una pseudo-partícula embebida en el dieléctrico del sustrato, con su propia constante dieléctrica, que se acopla con la partícula real produciendo hibridación de los modos plasmónicos [333]. Si la constante dieléctrica del sustrato es mayor que la del medio externo a la nanopartícula, la resonancia se desplaza hacia menores valores de energía, es decir, mayores longitudes de onda. Este desplazamiento hacia mayores longitudes de onda es mayor cuanto mayor es el índice de refracción del sustrato y solo empieza a causar efecto cuando la nanopartícula se acerca a una distancia del sustrato igual o menor a su propio diámetro [312,334].

Por otro lado, cuando dos partículas están muy cerca pueden interactuar y sus momentos dipolares se pueden acoplar desplazando el máximo de adsorción hacia mayores longitudes de onda [335]. En las imágenes SEM de los recubrimientos (Figura 3.3) podemos observar que existen Ag nPlates muy próximos unos a otros, por lo que podría ser este el efecto que hace que el SPR de los sustratos SERS se desplace a mayores longitudes de onda.

Una banda de adsorción tan ancha favorece el acoplamiento del SPR con diferentes longitudes de onda de excitación del láser y especialmente con el de 785 nm muy próximo al máximo de absorción. El espectro de absorción UV-Vis-NIR de la malla de acero y el grafito aparece en la Figura 3.4b y c. En ambos casos aparece un aumento de la adsorción en torno a 700-1000 nm y que se debe al SPR de los Ag nPlates. Para más información sobre la metodología experimental de medida ver Anexo I-e (pág. 252).

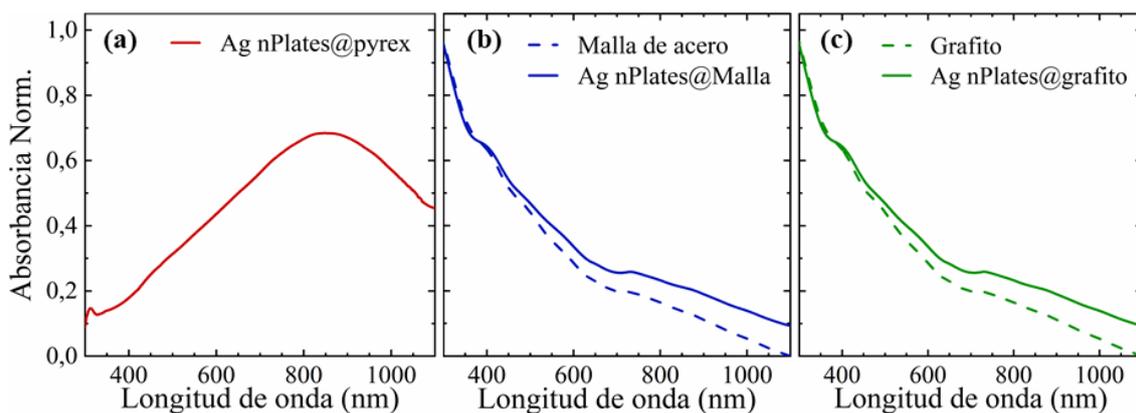


Figura 3.4 Espectro de adsorción UV-Vis-NIR de los Ag nPlates depositado sobre los diferentes soportes: **(a)** pyrex; **(b)** malla de acero y **(c)** grafito. (b) y (c) incorporan el espectro del correspondiente material sin Ag nPlates.

3.3.2 Espectroscopía Raman de los sustratos SERS con R6G

Los tres sustratos SERS se caracterizaron con R6G como molécula patrón y las longitudes de onda de excitación de 532 nm, 633 nm y 785 nm, calculando el AEF para todas las combinaciones. Los espectros SERS crudos se representan en la Figura 3.5a-c. La mayor intensidad Raman de la R6G y con menor señal-ruido se obtuvo con la línea láser de 532 nm (Figura 3.5a). La intensidad Raman depende del número de moléculas muestreadas, pero, cuando la molécula es un cromóforo, y se está cerca de su frecuencia de excitación también depende del fenómeno denominado dispersión Raman resonante (RSS, de sus siglas en inglés *Resonant Raman Scattering*). La RSS se produce cuando la frecuencia del haz incidente supera las frecuencias electrónicas de los estados excitados y resuena en ellos. La señal Raman que se origina a partir de estas transiciones electrónicas entre los estados se intensifica de tres a seis órdenes de magnitud en comparación con la señal Raman “normal” (fuera de la resonancia del cromóforo), y, en estos casos la técnica pasa a llamarse *SERRS (Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering)* en lugar de SERS [28]. La frecuencia de excitación o máximo de adsorción de la molécula de R6G está centrada en 530 nm, y al iluminar con la línea de 532 nm se produce el fenómeno RSS obteniéndose espectros más intensos y limpios.

Por otro lado, la R6G al absorber energía a 532 nm genera fluorescencia, pero cuando las moléculas se anclan al metal, se puede producir un cierto *quenching* fluorescente⁵ o desactivación de la fluorescencia debido a interacciones no radiativas con la superficie

⁵ El término *quenching* fluorescente hace referencia a cualquier proceso que produzca una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida por una determinada sustancia.

del metal, es decir, sin absorción o emisión de fotones. Sí comparamos los espectros obtenidos con la línea láser de 532 nm para los tres sustratos SERS, la fluorescencia de la R6G puede observarse como una banda ancha en el espectro centrada a 600 cm^{-1} . El *quenching* fluorescente de la señal es más efectivo en el caso del soporte de grafito, Ag nPlates@grafito. El grafito junto con otros materiales carbonosos como los nanotubos de carbono o el óxido de grafeno tiene la capacidad de desactivar la fluorescencia mediante mecanismos de transferencia de carga y/o energía [323], lo que les permite ser buenos soportes de sustratos SER(R)S. Por consiguiente, soportes con menor conductividad producirán menor *quenching* fluorescente. En nuestro caso, el soporte de SiO_2/Si es el que posee menor conductividad (10^{-1} S/m), y si observamos los espectros SERS del sustrato Ag nPlates@ SiO_2/Si son los que más fluorescencia y menor AEF (Figura 3.5c) presentan para todas las líneas laser estudiadas.

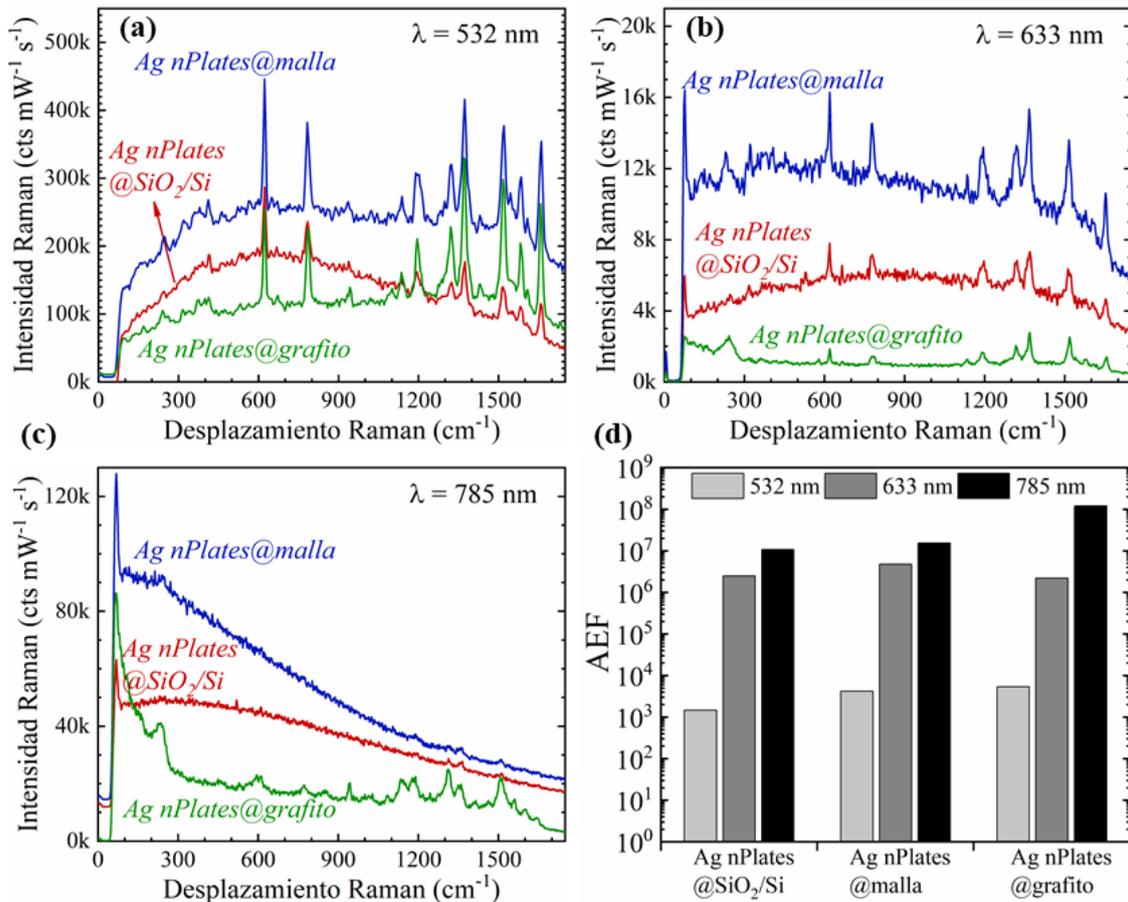


Figura 3.5 Espectro SERS de R6G 10^{-5} M recogidos sobre los tres diferentes sustratos SERS para tres longitudes de onda: (a) 532 nm; (b) 633 nm y (c) 785 nm. (d) AEF de los tres sustratos y las tres longitudes de onda de excitación. Para una mejor visualización los espectros de (a) y (c) se han desplazado en el eje-y.

La longitud de onda de excitación de 633 nm también permanece cerca de la energía de excitación de la R6G, lo que permite obtener los espectros Raman de la molécula, pero con menor intensidad que con la línea láser de 532 nm (Figura 3.5b). Por su parte, la línea laser de 785 nm coincide con el SPR de los tres sustratos SERS (ver Figura 3.4) pero solo con Ag nPlates@grafito conseguimos ver claramente el espectro Raman de la molécula de R6G. Esto puede estar debido a una transferencia de electrones entre los Ag nPlates y el grafito [323]. El aumento de la señal Raman debida a mecanismos de *quenching* fluorescente y de transferencia de carga y energía, junto con el bajo coste y fácil manipulación hacen de las planchas de grafito una interesante alternativa como soporte para la deposición de nanopartículas plasmónicas, es decir, como soporte de un sustrato SERS.

El cálculo del AEF se realizó con la intensidad promedio de 10 espectros medidos con cada una de las condiciones experimentales (sustrato y longitud de onda de excitación). En los tres sustratos estudiados el mayor AEF se obtuvo con la excitación de 785 nm (Figura 3.5d), incluso en el caso de Ag nPlates@SiO₂/Si y Ag nPlates@malla en los que su espectro Raman está menos definido. Esto se debe a la baja señal del espectro R6G medido en condiciones Raman (I_{Raman} de la Ecuación 2.4, pág. 50) con la longitud de onda de excitación de 785 nm. Esta línea láser está lejos del máximo de absorción de la R6G donde se producen los efectos de RSS de aumento de la señal Raman y donde I_{Raman} se hace máxima, y que hace que el AEF disminuya. En la Figura A.II.2 y Figura A.II.3 del Anexo II (pág. 258), aparecen los espectros de R6G 1 mM de referencia para las tres longitudes de onda de excitación.

3.3.3 Detección de DMMP en sustratos SERS Ag nPlates@grafito

Tras la caracterización de las propiedades plasmónicas de los tres sustratos SERS se pasó a estudiar en profundidad las capacidades de detección de DMMP en fase gas con el sustrato SERS Ag nPlates@grafito y la longitud de onda de excitación de 785 nm. También se probó con la longitud de onda de excitación de 633 nm y los sustratos Ag nPlates@SiO₂/Si y Ag nPlates@malla y no se obtuvo espectro Raman del DMMP. Tan pronto como focalizábamos el láser sobre estos sustratos las moléculas de DMMP se descomponían obteniéndose una banda ancha entre 1450 y 1700 cm⁻¹, correspondiente a la huella del carbono amorfo. Este fenómeno se atribuye a la descomposición fototérmica de las moléculas de DMMP adsorbidas en los *hot-spots* del metal [336].

Los espectros Raman del DMMP puro en fase líquida y los espectros SERS del DMMP en fase gas en una concentración de 2,5 ppmV recogidos sobre el sustrato Ag nPlates@grafito y medidos con el equipo Alpha 300 de sobremesa y el equipo Raman portable aparecen en la Figura 3.6a y Figura 3.6b, respectivamente. En primer lugar, podemos observar que con ambos equipos el sustrato Ag nPlates@grafito es capaz de monitorizar la huella dactilar de la molécula de DMMP en fase gas, sin embargo, la intensidad relativa de las bandas difiere de la obtenida para el DMMP líquido puro. Las bandas son más anchas y están ligeramente desplazadas en los espectros SERS medidos con el equipo portable, esto se debe a la menor resolución espectral de este (6 cm^{-1}) en comparación con el equipo Alpha 300 de sobremesa que tiene una resolución de 2 cm^{-1} .

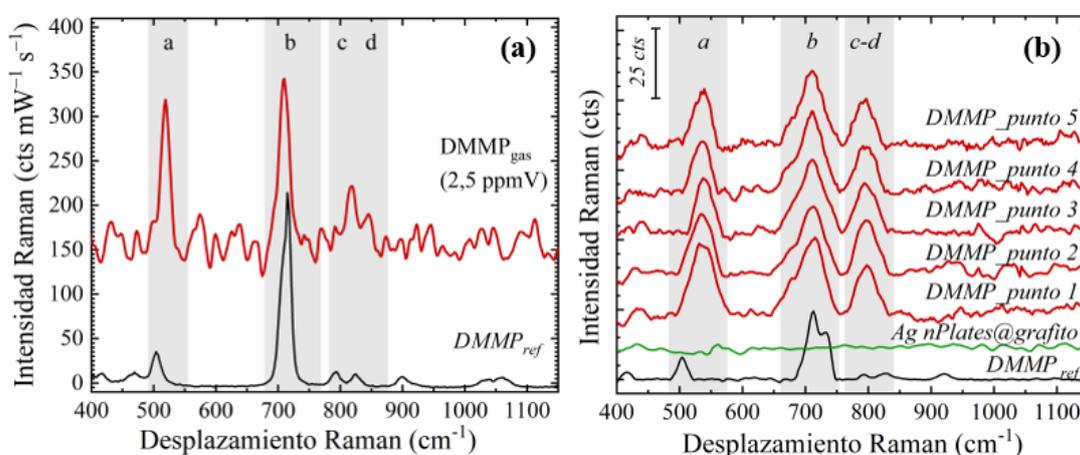


Figura 3.6 Espectro Raman del DMMP en fase gas (2,5 ppmV) medido sobre el sustrato Ag nPlates@grafito usando: (a) el equipo Alpha 300 de sobremesa y (b) el equipo Raman portable. Fuente de excitación 785 nm. En (b) aparece el espectro de DMMP en fase gas medido en diferentes puntos del sustrato Ag nPlates@grafito. En sombreado gris aparecen remarcados los principales modos vibracionales del DMMP (para más información ver Tabla 3.1). Los espectros han sido desplazados en el eje-y para una mejor comparación de los resultados. En ambos casos se adjunta el espectro del DMMP en fase líquida como referencia.

La reproducibilidad de la medida y del sustrato SERS aparece recogida para el caso de las medidas realizadas con el equipo Raman Portable en la Figura 3.6b, donde se pueden observar los espectros SERS del DMMP recogido en 5 puntos diferentes del sustrato Ag nPlates@grafito. En todos los espectros podemos observar tres bandas características del DMMP y similares intensidades y asignadas al PO_3 bending (banda a), P-C stretching (banda b) y PO_2 bending (banda c-d) (para más detalles ver Tabla 3.1). Estos espectros son la demostración de la identificación de DMMP en fase gas utilizando equipos portables similares a los utilizados en condiciones reales de campo y en concentraciones tan bajas como 2,5 ppmV.

Tabla 3.1 Asignación de las bandas experimentales y teóricas del DMMP en fase líquida y gas sobre Ag nPlates@grafito [337].

Banda	Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)					Asignación modos vibracionales
	Experimental líquido puro	Teórico DMMP en el vacío	Vapores DMMP medidos sobre Ag nPlates@grafito		Teórico Ag-DMMP (PO ₃) _{umbrella}	
			Equipo Alpha 300	Equipo Raman Portable		
a	504	483	483	483	483	PO ₃ <i>Bending</i>
b	718	672	672	672	672	PCH₃ <i>stretching</i>
c	794	756	756	756	756	PO ₂ <i>bending</i>
d	825	791	791	791	791	PO ₂ <i>bending</i>

En literatura aparece reportada la interacción irreversible de la molécula de DMMP con electrodos texturizados de plata a través del enlace P-O [324] sin producirse cambios en las intensidades relativas de los picos. Para explicar nuestro ligero desplazamiento de los picos de DMMP cuando se adsorbe sobre los Ag nPlates y el cambio de intensidades relativas se realizó un estudio más profundo de la interacción del DMMP - Ag mediante cálculos computacionales DFT. La Figura 3.7a muestra la geometría de las dos interacciones DMMP-Ag estudiadas y la geometría optimizada de la molécula de DMMP en el vacío. La geometría más estable, de entre las estudiadas, se corresponde al acercamiento del DMMP a los seis átomos de Ag a través del enlace P=O (geometría (iii) de la Figura 3.7a), coincidiendo con lo reportado previamente en literatura [324]. Un complejo menos estable fue el obtenido al aproximar el DMMP a los seis átomos de Ag a través de sus tres oxígenos, complejo Ag – DMMP*, como si los oxígenos fueran un paraguas sobre la plata y denominado (PO₃)_{paraguas}.

La Figura 3.7b muestra el espectro Raman simulado de la molécula de DMMP en el vacío y de los complejos DMMP – Ag simulados. Si comparamos las bandas principales del espectro Raman obtenido experimentalmente y el obtenido por simulación, Figura 3.6 y Figura 3.7b, respectivamente, ambos muestran bandas similares, aunque es claramente apreciable el cambio de intensidades relativas y el desplazamiento de bandas. Las bandas experimentales desplazadas a 504 y 718 cm⁻¹ asignadas al (PO₃)_{paraguas} *bending* y al P-C *stretching*, respectivamente, en la simulación aparecen desplazadas a 483 y 672 cm⁻¹ (para más detalles ver Tabla 3.1). Si comparamos la intensidad relativa entre el pico a 672 cm⁻¹ con y la del pico 483 cm⁻¹ para la molécula de DMMP y para los complejo Ag – DMMP

(P=O) podemos observar que es parecida. Sin embargo, para el complejo simulado Ag – DMMP* (PO₃) se observa un cambio de las intensidades relativa entre ambos picos, similar al observado experimentalmente. Este resultado puede estar indicando como es experimentalmente la adsorción del DMMP sobre los Ag nPlates. Señalando que aun siendo una geometría menos favorable está contribuyendo de manera activa a la respuesta SERS. También se tiene que considerar la posibilidad de que el resultado este debido a que solo estamos simulando una molécula de DMMP interaccionando con 6 átomos de Ag, cuando experimentalmente la molécula de DMMP puede interaccionar no solo con átomos de Ag sino también con otras moléculas de DMMP aumentando las posibilidades de una interacción (PO₃)paraguas – Ag.

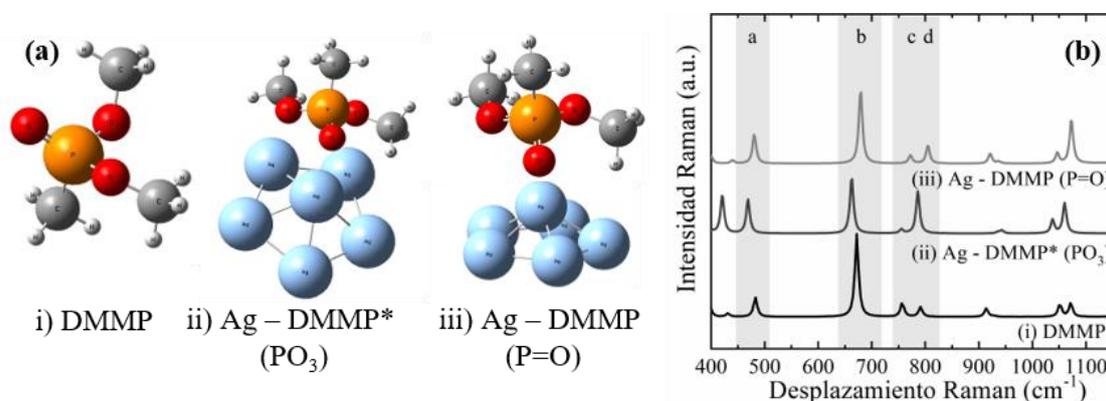


Figura 3.7 (a) Optimización de las geometrías de la molécula de DMMP en el vacío (i) y absorbida en seis átomos de Ag a través de (ii) los tres átomos de oxígeno del DMMP (PO₃) o (iii) del grupo P = O. Leyenda de colores: P en naranja; O en rojo; C en gris oscuro; H en blanco y Ag en azul. (b) Espectro calculado del DMMP (i) y de los complejos DMMP-Ag (ii) y (iii) de (a). Las áreas sombreadas indican los principales modos vibracionales del DMMP (más información en Tabla 3.1).

La reproducibilidad de la metodología de fabricación de los Ag nPlates@grafito se evaluó midiendo las capacidades de detección de DMMP sobre tres sustratos diferentes. Cada sustrato se midió en 10 puntos diferentes con el Raman portable y una concentración de DMMP en fase gas de 2,5 ppmV. Los resultados de la intensidad media del pico a 712 cm⁻¹ aparecen en la Figura 3.8a y mostraron una desviación estándar relativa (RSD, de sus siglas en inglés *Relative Standard Deviation*) del 5%. Este valor indica la buena reproducibilidad del método de fabricación de los sustratos y las capacidades de detección de los sustratos Ag nPlates@grafito. De hecho, recientemente se ha publicado que valores de desviación estándar por debajo del 20% son razonables para el estado del arte actual en la fabricación de sustratos SERS [51].

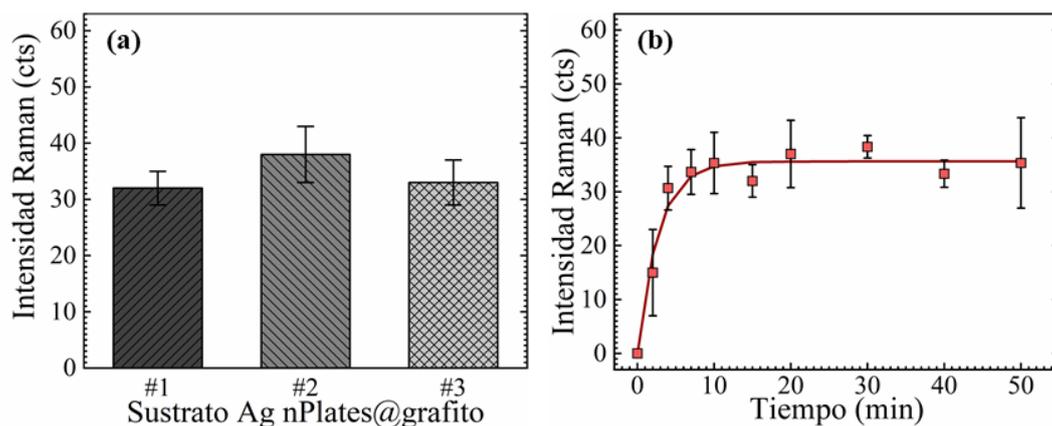


Figura 3.8 (a) Reproducibilidad de los sustratos Ag nPlates@grafito: intensidad media del pico de DMMP desplazado a 712 cm^{-1} para una concentración de 2,5 ppmV. (b) Intensidad del pico a 712 cm^{-1} del DMMP en función del tiempo de exposición a 2,5 ppmV de DMMP. Ambos medidos con el equipo Raman portable. Las barras de error indican la desviación estándar.

También evaluamos el tiempo de respuesta del Ag nPlates@grafito como sensor SERS en la detección de agentes neurotóxicos en fase gas. La Figura 3.8b muestra la evolución de la intensidad del pico de DMMP desplazado a 712 cm^{-1} en función del tiempo de exposición a los vapores de concentración 2,5 ppmV. De estos calculamos el $t_{50\%}$ y el $t_{90\%}$ que se definen como el tiempo que cuesta alcanzar el 50% y el 90% de la intensidad final, respectivamente, y que fueron $t_{50\%} = 137\text{ s}$ y $t_{90\%} = 261\text{ s}$. Este valor de tiempo de respuesta es claramente más corto que el reportado hasta el momento en literatura [324] pero es importante destacar que el trabajo es de 1996 y necesitaban 40 min para detectar el espectro DMMP en una corriente saturada. En estos años la tecnología Raman y SERS han avanzado notablemente por lo que la comparación no es totalmente equitativa.

Finalmente, se estudió la estabilidad temporal del sustrato Ag nPlates@grafito. Para ello se dejó envejecer a temperatura ambiente y en oscuridad un sustrato no usado de Ag nPlates@grafito durante 75 días, transcurrido este tiempo se incubó durante 12 h en R6G 10^{-5} M , se lavó y se dejó secar. El espectro SERS de la R6G medida sobre el sustrato Ag nPlates@grafito recién preparado y envejecido aparece en la Figura 3.9. Es claramente visible que la intensidad SERS de la R6G disminuye al envejecer el sustrato. Si nos fijamos en la imagen SEM tomada al sustrato transcurrido dicho tiempo podemos observar que los Ag nPlates han perdido su forma y ahora son esferas de plata, menos activas en SERS, de ahí la disminución de la intensidad. Para una estimación cuantitativa se calculó el AEF pasando de $1,3 \times 10^8$ en el sustrato recién preparado a $2,53 \times 10^7$.

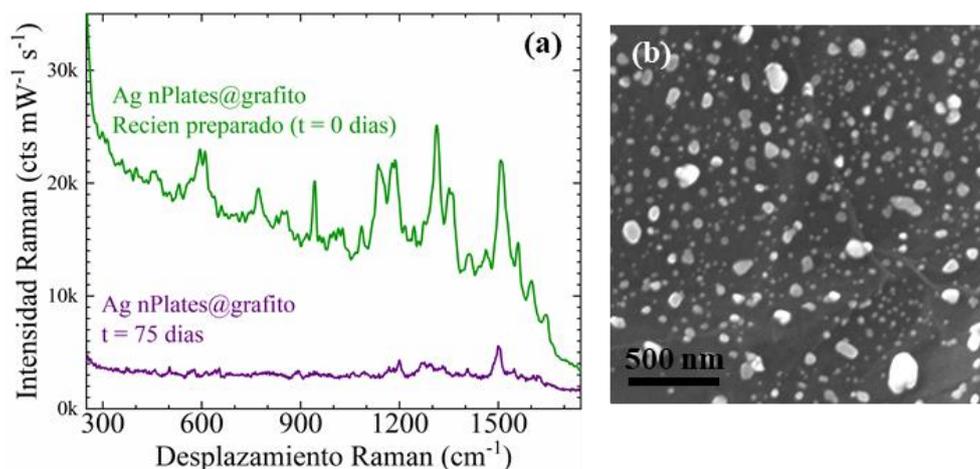


Figura 3.9 (a) Espectro SERS de la molécula de R6G 10 μ M recogido sobre un sustrato Ag nPlates@grafito recién preparado y en un sustrato Ag nPlates@grafito envejecido durante 75 días a temperatura ambiente y oscuridad. (b) Imagen SEM del sustrato Ag nPlates@grafito envejecido 75 días.

En resumen, el sustrato Ag nPlates@grafito tiene unas altas capacidades plasmónicas de aumento de la señal Raman que nos ayudan a detectar bajas concentraciones de DMMP en fase gas mediante una interacción irreversible Ag - DMMP pero en contraposición, el sustrato Ag nPlates@grafito tiene una baja estabilidad temporal lo que podría limitar su uso como sensor SERS de agentes químicos en fase gas.

3.4 CONCLUSIONES

En este capítulo han sido preparados y estudiado tres sustratos SERS con nanotriángulos de plata depositados tres soportes diferente naturaleza: una oblea SiO₂/Si, una malla de acero y una plancha de grafito. El efecto del soporte en la señal SERS ha sido evaluado para tres longitudes de onda de excitación 532, 633 y 785 nm y dos moléculas: R6G en fase líquida y DMMP en fase gas y concentración 2,5 ppmV.

Se ha demostrado que el mejor sustrato SERS, entre los estudiados, es Ag nPlates@grafito debido a su capacidad de disminuir la fluorescencia de la señal en las longitudes de onda de excitación de 532 y 633 nm mediante procesos de transferencia de carga y energía. Este fenómeno de transferencia de energía se hace vital en el caso de la longitud de onda de excitación de 785 nm, coincidente con el máximo de absorción de los Ag nPlates.

Este hecho permite al sustrato Ag nPlates@grafito detectar la huella dactilar del DMMP en fase gas a la longitud de onda de 785 nm. Al usar los sustratos

Ag nPlates@mallá y Ag nPlates@SiO₂/Si y láseres de excitación 532 y 633 nm se acumulaba tanta energía en la superficie que el DMMP se fotodescomponía.

La interacción del DMMP con la superficie de plata hace que las bandas e intensidades relativas de sus modos vibracionales se modifiquen ligeramente. La simulación DFT de diferentes complejos Ag – DMMP permitió elucidar que el DMMP se aproxima a la superficie mediante sus tres oxígenos (PO₃), conformación *paraguas*.

Las medidas SERS de detección de 2,5 ppmV de DMMP sobre diferentes sustratos SERS Ag nPlates@grafito reportaron la huella dactilar de la molécula en fase gas con una desviación estándar relativa (RSD) de la intensidad del 5% y un tiempo de respuesta menor a 140 s.

Estos resultados demuestran la alta calidad de los sustratos Ag nPlates@grafito como sensores SERS de moléculas en fase gas, que, combinados con equipos Raman portables, permitirán su aplicación en condiciones reales. Una posible desventaja de estos sustratos es su relativa baja estabilidad temporal y que serían de un solo uso debido a la interacción irreversible DMMP-Ag.

Capítulo IV

NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN FASE GAS Y LIQUIDA

Resumen

En este capítulo desarrollamos dos plataformas SERS basadas en nanopartículas de oro para su aplicación en la detección directa de compuestos organofosforados. En la primera parte, se sintetizan y caracterizan nanopartículas de oro recubiertas de citrato aplicadas a la detección de agentes neurotóxicos en fase gas. El citrato actúa de estabilizante y trampa molecular del DMMP a través de una interacción por puentes de hidrógeno reversibles. En este sistema se alcanzó un límite de detección de 130 ppbV. En la segunda parte se han sintetizado y depositado, en un solo paso, nanopartículas de oro recubiertas por dos polioxometalatos diferentes, PW y PMo, sobre microdispositivos poliméricos para la detección en continuo de pesticidas en fase líquida. Se ha estudiado la influencia de la naturaleza del POM en las propiedades finales del sensor SERS, alcanzando un límite de detección para el paraoxon de $41,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con el dispositivo AuNP@PW.

4 NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN FASE GAS Y LIQUIDA

4.1 INTRODUCCIÓN

El oro tiene buenas propiedades plasmónicas y una alta estabilidad [28], pero una baja afinidad con los compuestos organofosforados [7,308], lo que supone un problema a la hora de detectar agentes neurotóxicos en fase gas y pesticidas en fase líquida. Como se ha comentado en el Capítulo 1, una forma de solventar este problema es funcionalizar la superficie metálica con un agente de mayor afinidad con el analito [51,239,240]. Existen diferentes estrategias para aumentar la afinidad entre el sustrato y el analito organofosforado, entre otras, realizar un postratamiento de funcionalización de la superficie metálica con anticuerpos, aptámeros, polímeros o ligandos de diferente naturaleza. En este capítulo nos centramos en esta última vía de interacción con el analito.

En literatura se han reportado interacciones de diferente naturaleza entre el analito y el ligando que actúa como agente de afinidad. El ligando bifuncional 2-aminoetanotiol ha sido utilizado para funcionalizar nanoconos de Au que interactúan con el ácido metilfosfónico (MPA), producto de descomposición del gas sarín, detectando concentraciones de hasta 1 ppb [338]. Para la detección de vapores de CEES se han empleado AgFONs funcionalizados con 1-dedecanotiol que interactúa con la molécula de CEES mediante interacciones hidrofóbicas [339]. Esta funcionalización induce una orientación normal de la molécula de CEES respecto a la superficie metálica, la cual produce una ampliación de la señal SERS mayor que la orientación paralela [339]. 10 ppmV de benceno han sido detectados gracias a la interacción por fuerzas de Van der Waals con el propentiol con el que estaban funcionalizados nanorods de Ag [269]. Mediante interacción π - π entre el pesticida clorpirifós y el copolímero anfifílico que estabiliza unos nanocubos de Ag se han detectado concentraciones del pesticida de hasta 350 pg/L.

En nuestro caso y para reducir tiempo de postratamiento hemos sintetizado nanopartículas en las que el agente estabilizante actúe a su vez agente de afinidad. En la detección de DMMP en fase gas hemos seleccionado unas nanopartículas de oro

recubiertas de citrato, en las que el citrato es el reductor, estabilizante coloidal y trampa molecular de los vapores de DMMP.

Por su parte, en la detección de paraoxon en continuo en fase líquida, se han desarrollado y fabricado unos microdispositivos poliméricos en los que *in-situ* se han sintetizado nanopartículas de oro recubiertas de polioxometalatos, en adelante POMs, en las que el POM, actúa de mediador en los ciclos redox de formación de las nanopartículas, de estabilizante y de trampa molecular de las moléculas de paraoxon presentes en la disolución.

4.2 NANOPARTÍCULAS ORO RECUBIERTAS DE CITRATO PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS⁶

4.2.1 Procedimiento experimental

4.2.1.1 Materiales

Ácido cloroaúrico (HAuCl₄, ~ 50% básico), citrato de sodio tribásico dihidratado (>99%), cloruro de poli(alildimetilamonio) (PDDA, 20% en peso), ácido fosfotúngstico hidratado (H₃[P(W₃O₁₀)₄] \cdot xH₂O), rodamina 6G (R6G) y metilfosfonato de dimetilo (DMMP, 97%) se compraron en Sigma Aldrich y se usaron como se recibieron. Todas las disoluciones se prepararon con agua destilada. Las obleas de silicio con 1 μ m de óxido de silicio térmicamente depositado (SiO₂/Si) se adquirieron en Sil'Tronix. Los sustratos comerciales de oro SERStrate® fueron suministrados por SILMECO.

4.2.1.2 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro (AuNP@citrato)

La síntesis de las nanopartículas de oro recubiertas de citrato, en adelante AuNP@citrato, se realizó mediante una modificación de la clásica síntesis de Turkevich [93,340]. Brevemente, a 50 mL de una disolución acuosa de HAuCl₄ (1,1 mM) se le

⁶ El contenido de este capítulo ha sido adaptado de la siguiente publicación científica:

M. Lafuente, I. Pellejero, V. Sebastián, M.A. Urbiztondo, R. Mallada, M.P. Pina, J. Santamaría.

“Highly sensitive SERS quantification of organophosphorous chemical warfare agents: A major step towards the real time sensing in the gas phase”

Sensors and Actuators B, **2018**, 267, 457-566. DOI: 10.1016/j.snb.2018.04.058

añaden 5 mL de una disolución de citrato (38 mM). La reacción se lleva a cabo a 70 °C y bajo agitación magnética. Es recomendable precalentar la disolución de citrato antes de añadirla sobre el H₂AuCl₄. La disolución se mantiene a 70 °C hasta que alcanza un color rojo vino, alrededor de 10 min, previamente habrá sido amarilla, incolora y marrón. La suspensión de AuNP@citrato se utilizó sin postratamientos.

Para poder observar el recubrimiento de citrato alrededor de las partículas, se mezclaron 50 µL de la disolución de AuNP@citrato con 50 µL de ácido fosfotúngstico (7,5% en peso) durante 90 min. La dispersión se centrifugó y lavó 3 veces. El precipitado se redispersó en agua destilada y se colocó sobre una rejilla de TEM. El rendimiento de la síntesis se evaluó realizando la digestión de las AuNP@citrato en agua regia (3:1 – HCl:HNO₃ v/v) y posterior análisis de la muestra por espectroscopía de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MP-AES, Anexo I-j, pág. 255).

4.2.1.3 Preparación del sustrato SERS

Los sustratos SERS se prepararon sobre piezas de una oblea SiO₂/Si de 4 mm × 8 mm. Antes de comenzar con el depósito de las AuNP@citrato, los soportes de SiO₂/Si fueron lavados durante 10 min, y de manera secuencial, con acetona, isopropanol y agua en un baño de ultrasonidos; y secados bajo una corriente de N₂. A continuación, se les hizo un postratamiento de limpieza con plasma de oxígeno a 2,2 mbar, 100 W y durante 120 s. Posteriormente, se recubrieron mediante *spin coating* con una disolución de PDDA (0,2 % v/v en agua) a 3000 rpm durante 60 s. Tras un lavado y secado a 110 °C en un horno, los soportes se introdujeron en la suspensión de AuNP@citrato a una temperatura de 4 °C durante 16 horas. Tras este tiempo, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

El protocolo de medida y cálculo del AEF aparece detallado en el apartado 2.2, pág. 50. Los experimentos de detección de DMMP se realizaron con el equipo Alpha 300 de sobremesa. En general, y a no ser que se especifique lo contrario, las condiciones de medida en la detección de DMMP, y cálculo de AEF, fueron una potencia del láser de 2,5 mW, la longitud de onda de excitación de 785 nm, objetivo del microscopio 50x, tiempo de adquisición 20 s y una acumulación. Los vapores de DMMP de 2500 ppbV (2,5 ppmV) se generaron usando un tubo de permeación calibrado (ver apartado 2.3.4.1, pág. 57) y los de 1200 ppbV y 625 ppbV se prepararon con bolsas de gases según el protocolo explicado en el apartado 2.3.4.2, pág. 59.

4.2.2 Resultados

4.2.2.1 Caracterización de los sustratos SERS

El rendimiento de la reacción de Au^{3+} a Au^0 en la síntesis de las nanopartículas de oro recubiertas de citrato, en adelante AuNP@citrato, fue de un 97%. La morfología de las AuNP@citrato y el espesor de la capa de citrato alrededor de las mismas fue examinada por TEM (Figura 4.1a-c) observándose nanopartículas casi esféricas con un diámetro medio de 22 ± 9 nm ($N > 300$), una elongación de 1,22 y un espesor del recubrimiento de citrato de 2-3 nm ($N > 500$), esta capa puede observarse en la Figura 4.1b. El radio hidrodinámico medido por DLS fue 30 ± 5 nm (Figura 4.1c), en el mismo rango que el diámetro medido por TEM (polidispersidad = 0,083). El potencial-Z de las nanopartículas fue de -36 mV, lo que nos indica que las nanopartículas de AuNP@citrato no se agregan en disolución.

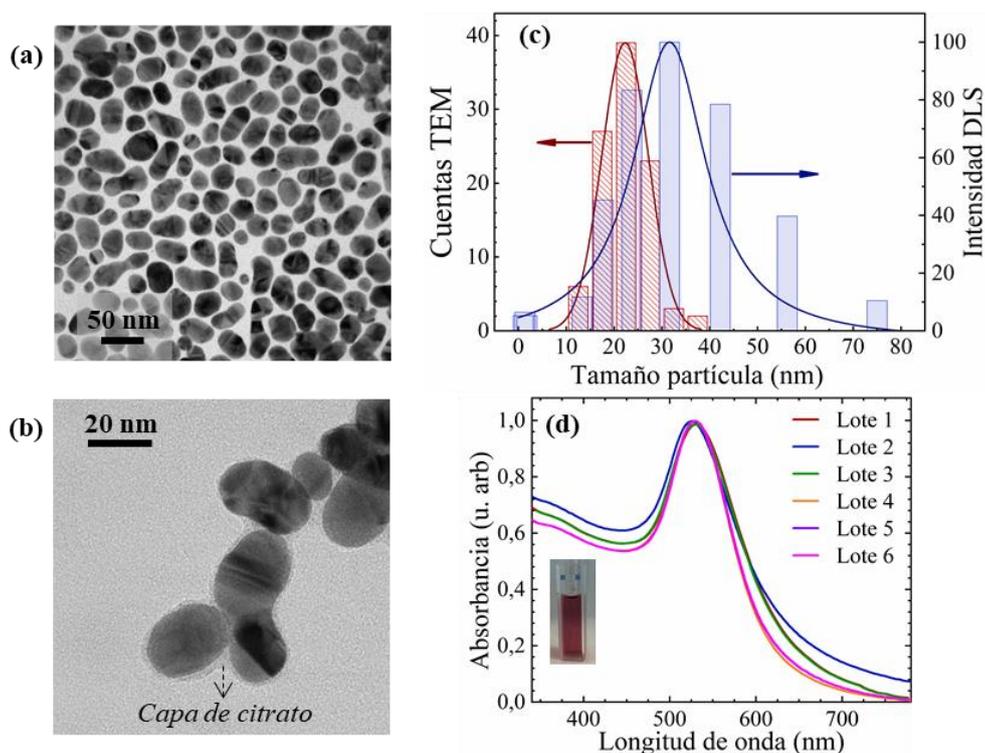


Figura 4.1 (a-b) Imágenes TEM de las AuNP@citrato. **(b)** Visualización de la capa de citrato que estabiliza las AuNP@citrato. **(c)** Distribución de tamaños de las AuNP@citrato medida por DLS (azul) y por TEM (rojo, $N > 100$). **(d)** Espectro UV-Vis de 6 lotes diferentes de AuNP@citrato. Inserto: imagen real del color de la disolución de AuNP@citrato.

El espectro de absorción UV-Vis de las AuNP@citrato muestra un máximo de absorción a 528 nm (Figura 4.1d), este valor concuerda con lo calculado teóricamente en literatura [341]. La Figura 4.1d muestra el espectro UV-Vis de 6 lotes de partículas

AuNP@citrato. Podemos observar que los espectros son prácticamente idénticos, indicándonos la buena reproducibilidad del protocolo de síntesis.

Los sustratos SERS se prepararon por interacción electrostática mediante la técnica LbL y usando como intermediario el polímero catiónico PDDA. La diferencia con el capítulo anterior, Ag nPlates sobre tres soportes diferentes, es que en esta ocasión el PDDA se depositó por *spin coating* en lugar de por inmersión. Para más información sobre la técnica LbL ver Anexo IV-a (pág. 264) y sobre la técnica *spin coating* ver Anexo IV-b (pág. 265). El *spin coating* es una técnica más rápida que la inmersión y muy adecuada para depositar capas finas sobre sustratos planos, para ello se optimizaron los parámetros de velocidad de espineado y concentración de PDDA. La optimización completa aparece en el Anexo IV-b.i (pág. 266) donde puede observarse que al aumentar la concentración de PDDA y disminuir la velocidad de espineado aumenta la densidad de AuNP@citrato sobre la oblea de SiO₂/Si. Tras el depósito de la capa de PDDA los sustratos se incubaron durante 12 h a 4 °C en la suspensión de AuNP@citrato, se lavaron con abundante agua y se dejaron secar al aire.

Los recubrimientos de AuNP@citrato obtenidos muestran una alta homogeneidad y una densidad de 700 nanopartículas/ μm^2 , lo que supone alrededor de un 30% de recubrimiento de la superficie del soporte (Figura 4.2a). Este valor de recubrimiento es ligeramente menor al obtenido con la misma técnica de deposición con los Ag nPlates (~ 42%), la diferencia puede estar debida a la forma de la nanopartícula. La estructura planar de los Ag nPlates hace que tengan mayor superficie de contacto e interacción con el soporte que la forma esférica de las AuNP@citrato.

El espectro de absorción del sustrato SERS de AuNP@citrato aparece en la Figura 4.2b y muestra una banda ancha con el máximo desplazado a 662 nm. Este desplazamiento hacia los rojos con respecto a la disolución de AuNP@citrato puede explicarse por un acoplamiento entre los momentos dipolares de partículas próximas [335].

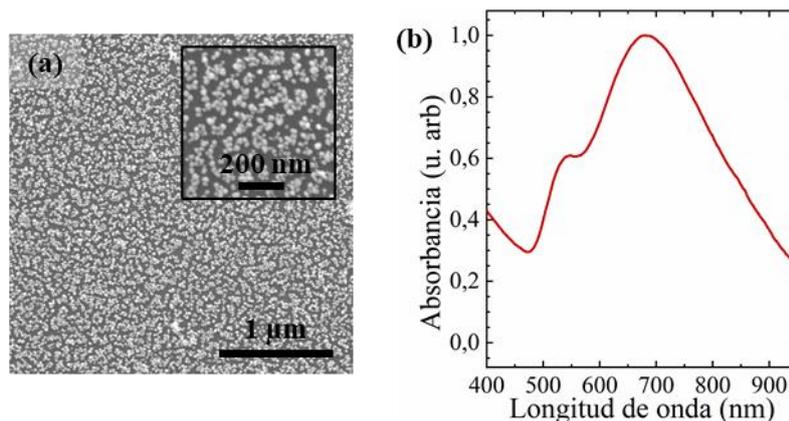


Figura 4.2 Caracterización del recubrimiento de AuNP@citrato sobre la oblea de SiO₂/Si. **(a)** Imagen SEM del recubrimiento usando PDDA como mediador y **(b)** dspectro de adsorción UV-Vis-NIR.

Por otro lado, la topografía del recubrimiento de AuNP@citrato fue estudiada mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) en condiciones ambientales (Figura 4.3a-b). El grado de recubrimiento estimado fue de un 35% y una rugosidad del orden de 7 nm, ambos calculados con las imágenes de AFM y el software Gwyddion 2.45. El mismo análisis se realizó para la capa de PDDA depositada sobre el soporte de SiO₂/Si obteniéndose un grosor de capa promedio menor a 1 nm (Figura 4.3c-d). Para ello, primero se exfolió con la punta del AFM una superficie de $2 \times 2 \mu\text{m}$ de la capa de PDDA y después se escaneó un borde, el perfil obtenido aparece en Figura 4.3d. Estudios previos demostraron que para eliminar la capa por completo sin rallar la superficie de SiO₂/Si había que aplicar una fuerza de 1 μN, 256 líneas/área y una velocidad de escaneado de 1 Hz. Al exfoliar la capa de PDDA los residuos de esta se acumulan en el lateral, zona más brillante de la imagen AFM de la Figura 4.3c.

La distancia promedio entre dos nanopartículas AuNP@citrato contiguas midiendo de centro a centro de estas en las imágenes de SEM y TEM es de $30,2 \pm 8 \text{ nm}$ ($N > 300$). Este valor está en el mismo orden que el calculado teóricamente, 35 nm, a partir del número de partículas por unidad de área y con las dimensiones de una nanopartícula. Esta distancia de centro a centro nos deja una distancia real entre partículas de menos de 10 nm, distancia que está dentro del orden de magnitud establecido para conseguir las mayores amplificaciones del campo electromagnético mediante efecto SERS, 2-20 nm [35,273,342].

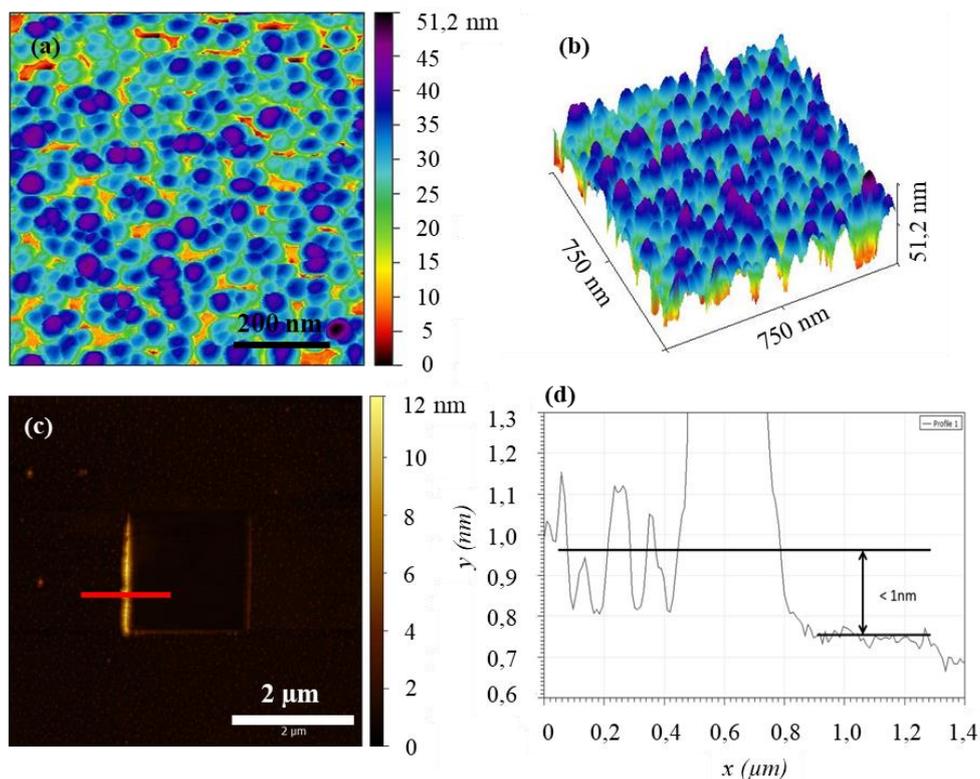


Figura 4.3 Caracterización AFM de la topografía del recubrimiento de AuNP@citrato sobre la oblea de SiO₂/Si: perspectiva 2D (a) y 3D (b). Evaluación del grosor de la capa de PDDA depositada sobre la oblea de SiO₂/Si: (c) imagen AFM de la zona exfoliada y (d) perfil de espesor correspondiente a la línea roja de (c).

4.2.2.2 Cálculo del AEF con R6G

El AEF se calculó utilizando como molécula patrón R6G y escaneado 3 áreas del sustrato SERS AuNP@citrato de $200 \times 150 \mu\text{m}$ recogiendo 225 espectros en cada una de ellas. La reproducibilidad de la señal y la homogeneidad del sustrato puede observarse en los mapas de intensidad del pico desplazado a 1510 cm^{-1} de la R6G recogidos en diferentes zonas del sustrato (Figura 4.4a). La RSD del pico monitorizado es un 15%, lo que muestra el alto potencial de la técnica LbL para preparar sustratos con actividad SERS a escala de centímetros cuadrados. El espectro promedio de cada una de las áreas aparece en la Figura 4.4b. La huella dactilar de la R6G aparece acompañada de otros picos provenientes de la molécula de citrato que recubre las AuNP@citrato y que se identifican más adelante (Tabla 4.1).

Del promedio de la intensidad media de estas áreas se calculó el AEF, obteniéndose una amplificación de la señal de $9,2 \times 10^6$. Este valor es inferior al medido con los Ag nPlates@grafito, $1,2 \times 10^8$. La magnitud de la amplificación depende de varios

factores entre los que se encuentran el metal plasmónico [28], la longitud de onda de excitación [303], y la distancia interpartícula [35]. En este caso, la diferencia de AEF puede estar debida a que la plata tiene mejores propiedades ópticas que el oro [28], y al hecho de no estar iluminando el sustrato AuNP@citrato con la longitud de onda de excitación más próxima al SPR de las nanopartículas, 633 nm y 662 nm, respectivamente. El sustrato SERS AuNP@citrato se midió con la longitud de onda de 785 nm para evitar la fotodescomposición del DMMP en fase gas a cambio de sacrificar la máxima amplificación del campo electromagnético, y, por tanto, la mayor señal Raman.

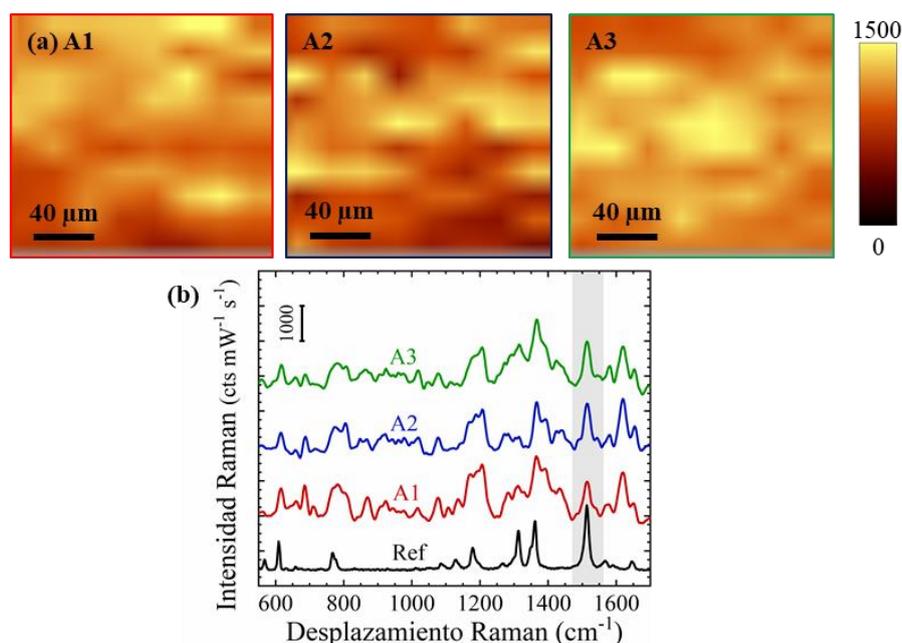


Figura 4.4 Caracterización del AEF del sustrato SERS AuNP@citrato: **(a)** área SERS monitorizando la intensidad del pico desplazado a 1510 cm^{-1} de la R6G ($1\text{ }\mu\text{M}$); **(b)** espectro SERS promedio obtenido en cada una de las áreas de (a) junto con la referencia de la huella de la molécula de R6G medida en estado sólido. La zona sombreada señala el pico monitorizado.

Por otro lado, durante el desarrollo de esta tesis se realizó un estudio de como la distancia entre partículas de oro puede afectar al AEF [177]. Para ello, en primer lugar, se reemplazó el citrato de las AuNP@citrato por el ligando hidrófobo 1-octadecanetiol, y se redispersaron en diferentes ratios de hexano: cloroformo. A continuación, se depositaron sobre SiO_2/Si mediante la técnica de Langmuir-Schaefer y dependiendo del ratio de disolventes se obtuvieron diferentes grados de recubrimiento Figura 4.5. Los mejores resultados se obtuvieron para el ratio 1:5 que se corresponde con una densidad de AuNP de $3100\text{ AuNP}/\mu\text{m}^2$, cuatro veces mayor que la obtenida mediante LbL por interacciones electroestáticas de las AuNP@citrato, y que aumenta el AEF a $4,3 \times 10^8$,

un orden de magnitud mayor que las AuNP@citrato medidas con el láser de 633 nm, $6,4 \times 10^7$.

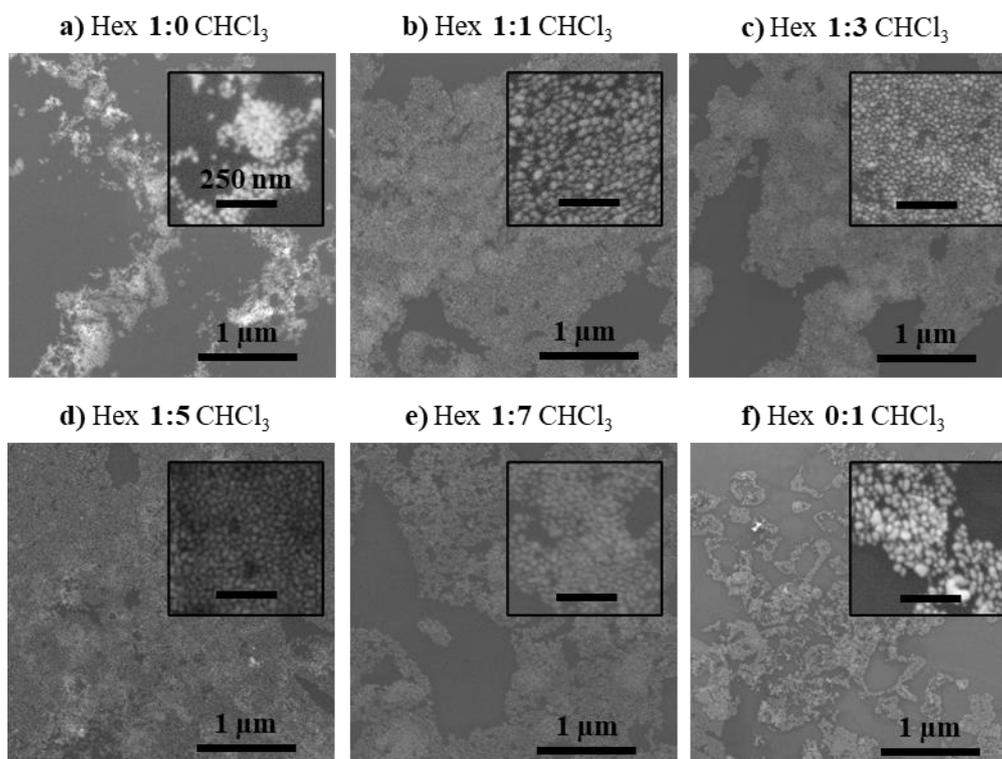


Figura 4.5 Imágenes SEM de las nanopartículas AuNP funcionalizadas con 1-octadecanetiol y depositadas por Langmuir-Schaefer sobre SiO₂/Si en función del ratio de disolventes hexano: cloroformo (a) 1:0; (b) 1:1; (c) 1:3; (d) 1:5; (e) 1:7 y (f) 0:1.

4.2.2.3 Detección de DMMP en fase gas

Las capacidades de detección del sustrato SERS AuNP@citrato se estudiaron usando como analito diana vapores de DMMP con una concentración de 2,5 ppmV. En la Figura 4.6 podemos observar cómo se modifica el espectro SERS del sustrato AuNP@citrato una vez se alimentan los vapores de DMMP. El espectro obtenido es la mezcla de los modos vibracionales del DMMP junto con los del citrato [343]. En la Tabla 4.1 se detallan las asignaciones de los picos. El modo vibracional principal del DMMP correspondiente al enlace P-C aparece ligeramente desplazado a 708 cm^{-1} (banda g de la Figura 4.6). El pico del P-C así como el resto de enlaces donde está implicado el átomo de fósforo, banda del P=O a 1220 cm^{-1} (banda p), banda del O-P-O a 788 cm^{-1} (banda i) y los modos vibracionales del enlace P-O-CH₃ y (PO₃)_{paraguas} a 467 y 492 cm^{-1} (bandas a y b), respectivamente, aparecen en una zona espectral carente de interferencias de modos vibracionales del citrato. Por el contrario, las bandas desplazadas a 877, 1028, 1081 y

1162 cm^{-1} correspondientes a los modos vibracionales de CH_3 , C-O aparecen superpuestas con bandas vibracionales del citrato provenientes de sus enlaces C-COO y C-O.

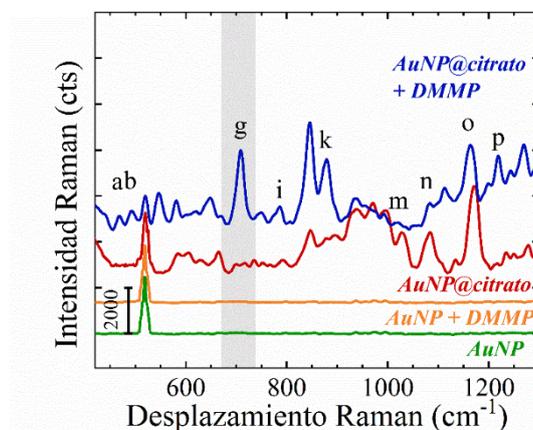


Figura 4.6 Espectro SERS del sustrato SERS AuNP@citrato antes (rojo) y después (azul) de ser expuesto a vapores de DMMP de 2,5 ppmV. Del mismo modo, se muestra el espectro SERS del sustrato AuNP, sin citrato, antes (verde) y después (naranja) de ser expuesto a los vapores de 2,5 ppmV de DMMP. Los espectros han sido desplazados en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados.

Tabla 4.1 Asignación de las bandas SERS mostradas en la Figura 4.6 durante la detección de vapores de DMMP sobre el sustrato SERS AuNP@citrato. En negrita las bandas pertenecientes al DMMP.

Banda	Desplazamiento Raman (cm^{-1})	Molécula	Modo vibracional
a	467	DMMP	δ (POCH_3)
b	492	DMMP	δ (PO_3)paraguas
c	519	SiO_2/Si	Si-O-Si
d, e y f	546, 579 y 678	Citrato	ν (COO^-)
g	708	DMMP	ν (P-C)
h	747	Citrato	ν (C-C)
i	788	DMMP	δ (PO₂)
j	844	Citrato	ν_s (C-COO)
k	877	Citrato y DMMP	ν (C-COO) + ν (CH₃)
l	936	Citrato	ν (C-COO)
m	1028	Citrato y DMMP	ν (C-O)
n	1081	Citrato y DMMP	ν (C-O)
o	1162	Citrato y DMMP	ν (C-COO) + δ (CH₃)
p	1220	DMMP	ν (P=O)
q	1268	Citrato	ν (C-COO)

δ : bending; ν : stretching; ν_s : stretching simétrico

La interacción del DMMP con los aniones de citrato se estudió por espectroscopía infrarroja (FTIR), Figura 4.7. El espectro FTIR del DMMP puro (espectro negro en Figura 4.7b) posee una banda característica a 1242 cm^{-1} correspondiente al enlace P-O. Tras saturar el sustrato SERS AuNP@citrato con vapores de DMMP (espectro azul) dicha banda se desplaza hacia menores frecuencias, 1230 cm^{-1} . Estudios recientes han demostrado que los aniones de citrato se coordinan con la superficie del metal a través de los grupos carboxilato dejando el grupo hidroxilo expuesto para poder interactuar con otras moléculas [344]. Por tanto, este desplazamiento podría atribuirse a una posible interacción entre las moléculas de DMMP y los grupos hidróxilo libres del citrato que hacen decrecer la frecuencia de vibración del enlace P-O [345]. La banda intensa desplazada a 1259 cm^{-1} se corresponde con la posición de la vibración de los grupos P-O cuando interactúan con otras moléculas. En la zona espectral de altas frecuencias, $3600\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$, aparecen los modos vibracionales de los grupos hidróxilo libres 3446 y 3257 cm^{-1} para la sal de citrato (espectro marrón) y desplazados a 3514 , 3396 , y 3317 cm^{-1} cuando interactúan con los vapores de DMMP que saturan el sustrato AuNP@citrato (espectro azul). Lo que podría confirmar la teoría de la interacción mediante puentes de hidrógeno entre el grupo P=O del DMMP y los grupos hidróxilo del citrato, P=O - - H (ver esquema de la Figura 4.7a). Esta interacción también explicaría el ligero desplazamiento de la banda vibracional P-C en el espectro SERS del DMMP obtenido sobre el sustrato SERS AuNP@citrato.

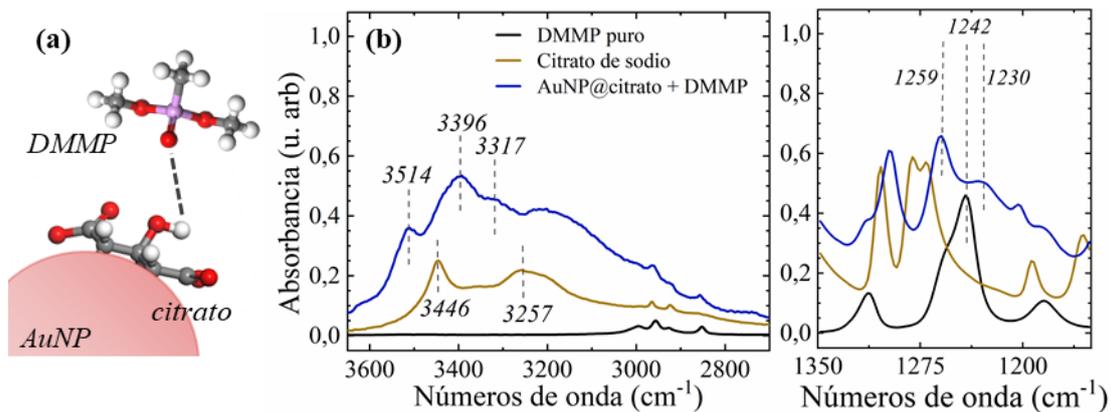


Figura 4.7 (a) Esquema de la formación del enlace P-O - - H mediante puentes de hidrógeno entre el grupo P=O del DMMP y el grupo OH del citrato. (b) Espectro infrarrojo FTIR entre 3650 y 2700 cm^{-1} y 1350 y 1150 cm^{-1} para el DMMP líquido puro (negro), la sal de citrato de sodio (marrón), y el sustrato AuNP@citrato después de ser expuesto a los vapores de $2,5\text{ ppmV}$ de DMMP (azul).

Para verificar el papel del del citrato en el anclaje de las moléculas de DMMP a la superficie metálica, a los sustratos SERS AuNP@citrato se les realizó un cuidadoso postratamiento con plasma de oxígeno para retirarles la capa de citrato de la superficie sin dañar las propiedades plasmónicas de las nanopartículas, estos sustratos se denominarán en adelante sustratos SERS AuNP (Figura 4.8). Se fijaron como condiciones óptimas una presión de la cámara de 0,2 mbar, potencia 50 W, 50% de O₂ y un tiempo de 45 s. En estas condiciones se consigue eliminar toda la capa de orgánica sin que las nanopartículas de oro pierdan su forma (Figura 4.8b), como ocurre en Figura 4.8c donde al aumentar el tiempo de exposición las nanopartículas sinterizan.

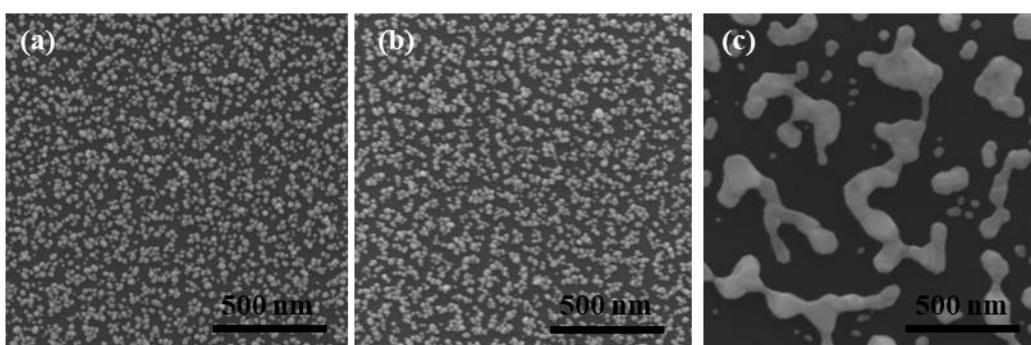


Figura 4.8 Imagen SEM del recubrimiento de AuNP@citrato sobre SiO₂/Si antes (a) y después (b) del postratamiento con plasma de oxígeno condiciones. (c) sustrato SERS AuNP@citrato con postratamiento agresivo (0,2 mbar,50 W, 3 min. 50% de O₂).

Tras este postratamiento, los sustratos SERS AuNP fueron expuestos a los vapores de DMMP con una concentración de 2,5 ppmV. Como puede observarse en la Figura 4.6 (espectro naranja) tras eliminar el citrato de la superficie de las nanopartículas no se obtiene la huella dactilar del DMMP. Concluimos así que el citrato juega un papel principal en la detección de vapores de DMMP fijando las moléculas a la superficie metálica donde se produce la mayor amplificación del campo electromagnético a través de una interacción por puentes de hidrógeno.

Por último, se compraron los sustratos comerciales de oro SERStrate® [346], Figura 4.9a. El sustrato comercial se colocó en la celda de gases y se alimentaron los vapores de DMMP. En la Figura 4.9b puede observarse que el espectro SERS no se ve alterado tras alimentar los vapores, debido a que el oro desnudo no es capaz de anclar las moléculas de DMMP.

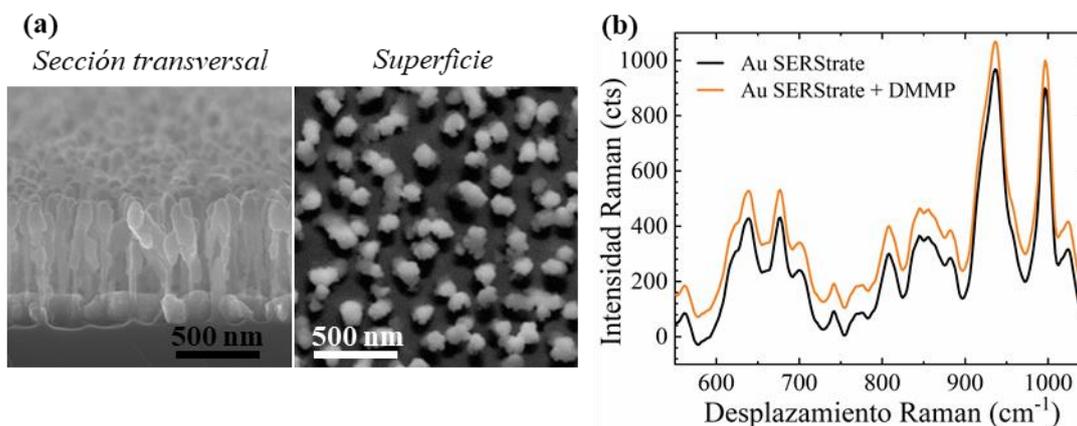


Figura 4.9 (a) Imagen SEM de los sustratos SERS de oro SERStrate® y (b) espectro SERS de los sustratos de oro SERStrate® antes y después de ser alimentados con vapores de DMMP (concentración 2,5 ppmV). Condiciones de medida 5 mW y 1 s.

La Figura 4.10a-b muestra la evolución de la intensidad del pico de DMMP desplazado a 718 cm^{-1} en función del tiempo de exposición a vapores de concentración 1,2 ppmV. Estudiando el comportamiento a tiempos de exposición largos evaluamos la estabilidad de la interacción DMMP-citrato (Figura 4.10a) y a tiempos cortos calculamos el tiempo de respuesta (Figura 4.10b).

En la Figura 4.10a aparece la evolución de la intensidad hasta 90 minutos y puede observarse que la intensidad aumenta rápidamente hasta alcanzarse un estado de pseudo-equilibrio entre las moléculas de DMMP en la fase gas y adsorbidas en la capa de citrato de las AuNP@citrato, demostrando la estabilidad de la interacción con el tiempo. La intensidad es el promedio de tres medidas realizadas a cada tiempo en tres posiciones diferentes del mismo sustrato.

En la Figura 4.10b aparece la evolución de la intensidad a tiempos cortos de exposición y donde se observa que el tiempo de respuesta es de 98 s. El experimento se realizó midiendo en un punto fijo del sustrato AuNP@citrato cada 0,5 s. Este tiempo de respuesta es ligeramente inferior al obtenido con los Ag nPlates@grafito, 137 s. No obstante, es importante destacar que el sustrato Ag nPlates@grafito se midió con el equipo Raman portable y un tiempo de integración de 100 s y el sustrato AuNP@citrato con el equipo de sobremesa y un tiempo de integración de 0,5 s, por lo que la comparación no es completamente correcta.

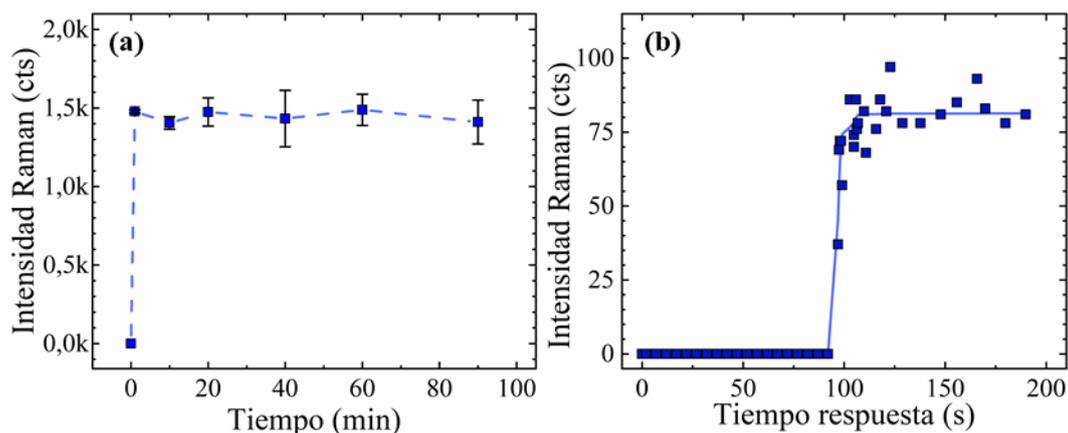


Figura 4.10 Evolución de la intensidad SERS del pico desplazado a 718 cm^{-1} del DMMP en función del tiempo de exposición a una concentración de $1,2\text{ ppmV}$. **(a)** Tiempos largos: estudio estabilidad de la interacción DMMP-citrato. Las barras de error representan la desviación estándar. **(b)** Tiempos cortos: estudio tiempo de repuesta del sustrato AuNP@citrato. Condiciones de medida: 1 mW y $0,5\text{ s}$.

La reciclabilidad del sustrato SERS AuNP@citrato se evaluó realizando ciclos consecutivos de adsorción/desorción del DMMP de la superficie del sustrato. La desorción completa del DMMP de la superficie se produce tras 25 min pasando una corriente seca de nitrógeno (Figura 4.11b). Cada ciclo de adsorción/desorción consistió en 10 min pasando DMMP, registrar la señal, a continuación, pasar 40 min de una corriente seca de N_2 y volver a registrar la señal en varios puntos para asegurar la completa desorción (flecha gris de la Figura 4.11a). La Figura 4.11 muestra como tras 10 ciclos de adsorción/desorción el sustrato AuNP@citrato sigue mostrando el mismo comportamiento y con una RSD de la intensidad de la señal Raman entre ciclos de un 5%.

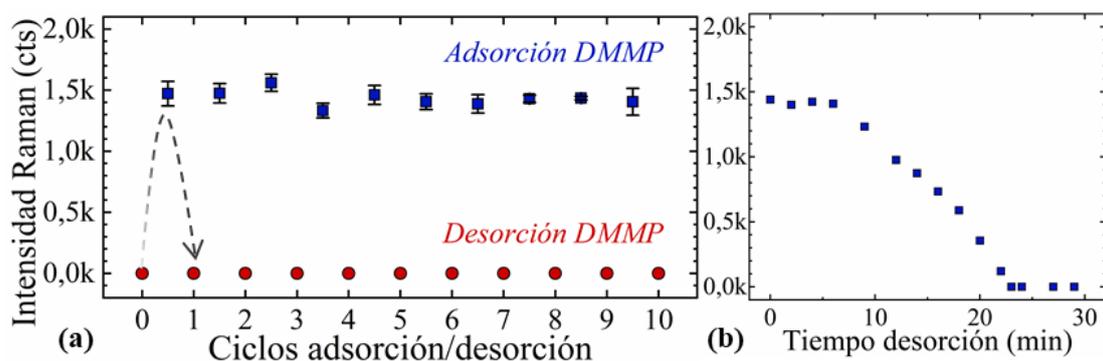


Figura 4.11 (a) Evolución de la intensidad SERS del pico de DMMP desplazado a 718 cm^{-1} en función de ciclos consecutivos de adsorción de $1,2\text{ ppmV}$ - desorción con N_2 de DMMP de la superficie del sustrato AuNP@citrato. La flecha indica un ciclo de adsorción/desorción. **(b)** Evolución del pico de DMMP desplazado a 718 cm^{-1} durante la etapa de desorción con una corriente de N_2 seca.

La homogeneidad del sustrato SERS en la detección de DMMP se estudió recogiendo 2500 espectros en un área de 1×1 mm. La Figura 4.12 muestra esta área monitorizando la intensidad del pico a 718 cm^{-1} del DMMP que tiene una RSD del 10%.

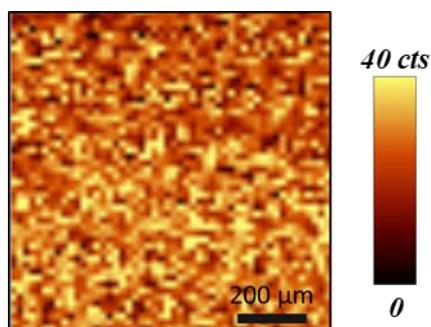


Figura 4.12 Área SERS de 1×1 mm monitorizando la intensidad del pico desplazado a 708 cm^{-1} del DMMP; 1 s de tiempo de integración.

Finalmente, se estudió la capacidad del sustrato AuNP@citrato para detectar concentraciones inferiores a las partes-por-millón (ppmV), requisito importante para una futura aplicación real. Para ello se prepararon bolsas de gases con concentraciones de 2500, 1200 y 625 ppbV.

La Figura 4.13 compara los espectros obtenidos para cada una de las concentraciones de DMMP estudiadas. El modo vibracional P-C es claramente observable para las tres concentraciones alimentadas y al disminuir la concentración podemos observar un pequeño desplazamiento hacia mayores números de onda, desde 708 cm^{-1} para 2500 ppbV hasta 720 cm^{-1} para 625 ppb. Este reportado que el desplazamiento de las bandas Raman de una molécula puede deberse a interacciones con otras moléculas o al grado de recubrimiento de éstas sobre la superficie plasmónica [218]. Este fenómeno es especialmente notable cuando se trabaja con bajas concentraciones del analito como es 625 ppbV.

La intensidad de la banda vibracional P-C del DMMP ($\sim 715 \text{ cm}^{-1}$) incrementa casi linealmente con la concentración (Figura 4.13b). En estas condiciones experimentales, se calculó el límite de detección (LOD, de sus siglas en inglés *Limit of Detetion*) como tres veces la desviación estándar de la intensidad de la banda vibracional P-C en cinco experimentos diferentes obteniéndose un LOD de 130 ppbV.

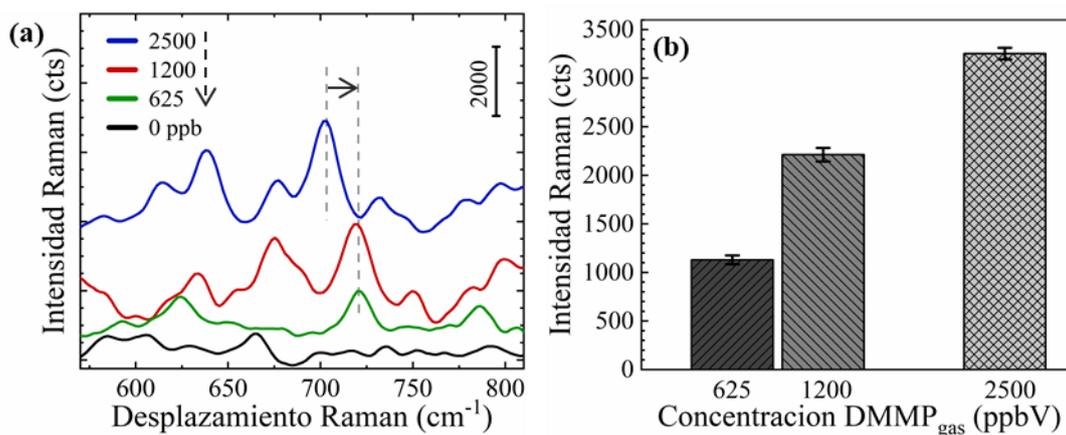


Figura 4.13 (a) Espectro SERS del DMMP recogido sobre el sustrato AuNP@citrato pasando N₂ y tres concentraciones de DMMP diferentes: 625, 1200 y 2500 ppb. Los espectros han sido desplazados en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados. La flecha indica el desplazamiento del P-C **(b)** Intensidad del modo vibracional P-C del DMMP desplazado a ~715 cm⁻¹ en función de la concentración de DMMP.

Todos estos resultados muestran la robustez de la plataforma SERS AuNP@citrato y de la interacción DMMP-citrato haciendo del sustrato SERS AuNP@citrato un potencial candidato para ser utilizado como sensor SERS de agentes neurotóxicos en fase gas.

4.3 NANOPARTÍCULAS ORO RECUBIERTAS DE POLIOXOMETALATOS (POMs) PARA LA DETECCIÓN DE PESTICIDAS EN FASE LÍQUIDA⁷

Los polioxometalatos (POMs), también llamados polioxoaniones, se definen como agregados inorgánicos de carácter aniónico y están formados principalmente por oxígeno, metales de transición (M) en su estado de oxidación más alto, y un heteroátomo (X). Los POMs pueden describirse como fragmentos discretos de óxidos metálicos, de tamaño y forma bien definida, formados por la reacción de condensación de complejos de coordinación, generalmente octaedros, tetraedros y pirámides de base cuadrada. Los polioxometalatos se pueden dividir en dos categorías, isopolioxometalatos y heteropolioxometalatos, perteneciendo a esta segunda categoría las estructuras de Keggin utilizadas en esta sección.

Se denomina estructura de Keggin a los compuestos $[XM_{12}O_{40}]^{3-}$, donde X es el átomo central que puede ser B^{III} , Si^{IV} , Ge^{IV} , P^V , As^V o metales de transición (Cu, Fe o Co) con diferentes estados de oxidación y M es Mo^{VI} o W^{VI} . En estas estructuras cuatro grupos M_3O_{13} se sitúan alrededor del heteroátomo de X que se encuentra unido tetraédricamente a cuatro ligandos oxo. Cada grupo M_3O_{13} es un conjunto de tres octaedros fusionados por las aristas con un vértice en común que es también un vértice del tetraedro central (Figura 4.14a). Existen cinco estructuras Keggin α , β , γ , δ y ϵ . La α posee una simetría T_d , si rotamos un grupo M_3O_{13} 60° tendremos el isómero β (simetría C_{3v}); dos, tres y cuatro grupos rotados 60° dan lugar a las formas γ , δ y ϵ , respectivamente. De esta forma, dentro de cada estructura Keggin existen cuatro tipos de oxígenos diferentes (ver Figura 4.14b): O_d , oxígenos terminales ($M=O$); O_b , oxígenos puente entre octaedros MO_6 que interactúan por el vértice; O_c , oxígenos puente entre grupos MO_6 fusionados por las aristas y O_a , átomo central de oxígeno que forma el heterogrupo PO_4 .

⁷ El contenido de este capítulo ha sido adaptado de la siguiente publicación científica:

M. Lafuente, I. Pellejero, A. Clemente, M.A. Urbiztondo, R. Mallada, S. Reinoso, M.P. Pina, L.M. Gandía.

“In-situ synthesis of SERS active Au@POM nanostructures in a microfluidic device for real time detection of water pollutants”

ACS Appl. Mater. Interfaces, 2020. DOI: 10.1021/acsami.0c06725

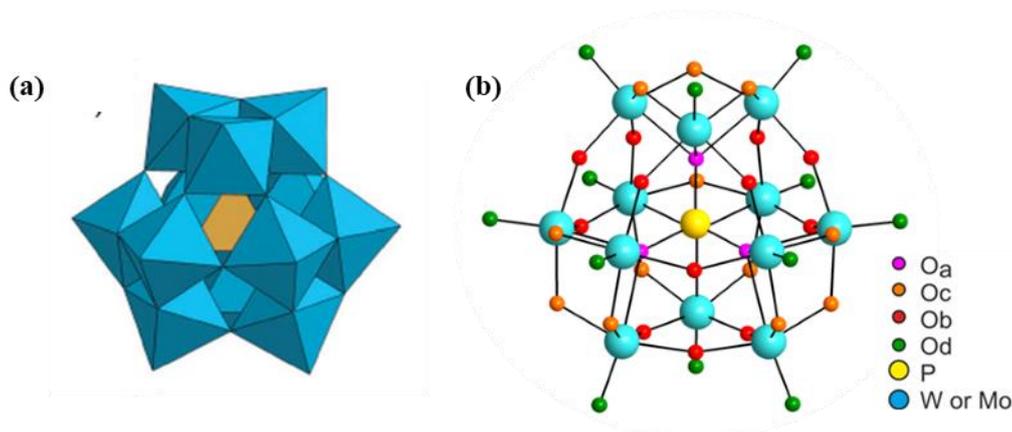


Figura 4.14 Representación de la estructura α -Keggin (a) poliédrica y (b) atómica identificando los cuatro tipos de oxígenos.

La estructura de Keggin es la más conocida y estudiada debido a su sencilla preparación, estabilidad térmica, y sus propiedades redox y de ácido fuerte. Además, la estructura Keggin y en general todos los POMs, pueden llevar a cabo reacciones de transferencia de electrones cuando son irradiados con luz ultravioleta sin sufrir descomposición química o estructural. Esta característica hace que los POMs sean muy utilizados en la síntesis de nanopartículas donde tienen una doble función: agentes reductores y estabilizantes de las nanopartículas [99,347,348].

A diferencia de otros estabilizantes de nanopartículas, los POMs tienen una reactividad única que permite que sean usados en un amplio rango de aplicaciones: foto y electrocatálisis, oxidación en fase líquida, biosensores, almacenaje de energía o medicina [349,350]. Sin embargo, su actividad SERS ha sido poco estudiada. En literatura se pueden encontrar ejemplos donde han sintetizado nanopartículas de plata estabilizadas con PW y ensamblado mediante remplazamiento galvánico a superficies de aluminio [351], la síntesis de nanopartículas bimetálicas preparadas por remplazamiento galvánico sobre TiO_2 impregnado con PW [352], nanopartículas de oro sintetizadas dentro de los canales de sílice mesoporosa [353], o nanopartículas de oro sintetizadas a las que se les ha remplazado el estabilizante de citrato por un POM de vanadio [354] y donde consideran que gracias a ello se aumenta en un orden de magnitud la señal obtenida.

4.3.1 Procedimiento experimental

Los dispositivos fueron diseñados y fabricados en colaboración con el Dr. Ismael Pellejero, asimismo, la síntesis de las nanopartículas de oro recubiertas de POM, en

adelante AuNP@POM, fue optimizada en colaboración con el propio Dr. Ismael Pellejero y el Dr. Santiago Reinoso del Instituto de Materiales Avanzados (InaMat) de la Universidad Pública de Navarra.

4.3.1.1 Materiales

El ácido cloroaúrico (HAuCl_4 , $\geq 99\%$), $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ hidratado (reactivo ACS), $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ hidratado (reactivo ACS), rodamina 6G (R6G, 99%) y paraoxon-metil fueron comprados a Sigma-Aldrich y el 2-propanol (99,5%) a Scharlau. El elastómero Sylgard 184 y su agente de curado fueron adquiridos en Dowsil. La resina para la impresora 3D B9R-6 fue adquirida a B9Creations. Todos los materiales fueron utilizados sin ningún pretratamiento. Los cubres de pyrex de grosor 150 μm fueron adquiridos en Labbox (ref. CCVN-020-100). Las conexiones de microfluídica fueron suministradas por Nordson.

Por otro lado, se utilizó la impresora 3D de alta resolución B9Creator con el software B9Creator V1.2 de B9Creations. El equipo de plasma corona utilizado fue BD-20AC de Electro-Technic Products. La lámpara LED LZ1-00UV00-LED con una longitud de onda de 365 nm y una potencia de 1,2 W se adquirió en Engin.

4.3.1.2 Preparación de los dispositivos de PDMS

Los dispositivos de polidimetilsiloxano (PDMS) constan de dos partes, una base y una cubierta, ambas preparadas por el método de *casting* sobre un molde fabricado por impresión 3D, basándonos en protocolos previos [355] (ver Figura 4.15). Brevemente, el molde 3D de la base fue diseñado en “negativo” con el software AutoCAD[®] y consistió en un serpentín de sección semicircular de diámetro 1 mm y altura 500 μm . El molde fue fabricado por impresión 3D usando la resina B9R-6. El molde 3D fue lavado con 2-propanol, secado, y, posteriormente, curado a 160 °C durante 1 h. La disolución de PDMS se preparó mezclando el elastómero Sylgard 184 con el agente de curado en una ratio 10:1 en peso y se vertió sobre el molde 3D. A continuación, se desgasificó a vacío y se dejó curar en un horno a 80 °C durante 30 min. La réplica de PDMS obtenida fue retirada con cuidado del molde 3D. Por otro lado, la cubierta del dispositivo se preparó por *casting* del PDMS sobre un molde plano. La cubierta final tiene 1 mm de grosor y una abertura central de 18 mm. La base y la cubierta se unieron mediante un tratamiento de plasma de aire. El dispositivo final de PDMS se curó durante una 1 h a 80 °C. En la abertura y entre ambas piezas antes de unir las se colocó el cubre de pyrex que cierra el dispositivo y que

actúa de ventana óptica para las medidas SERS. Por último, se colocaron las conexiones de microfluídica a la entrada y a la salida del dispositivo SERS.

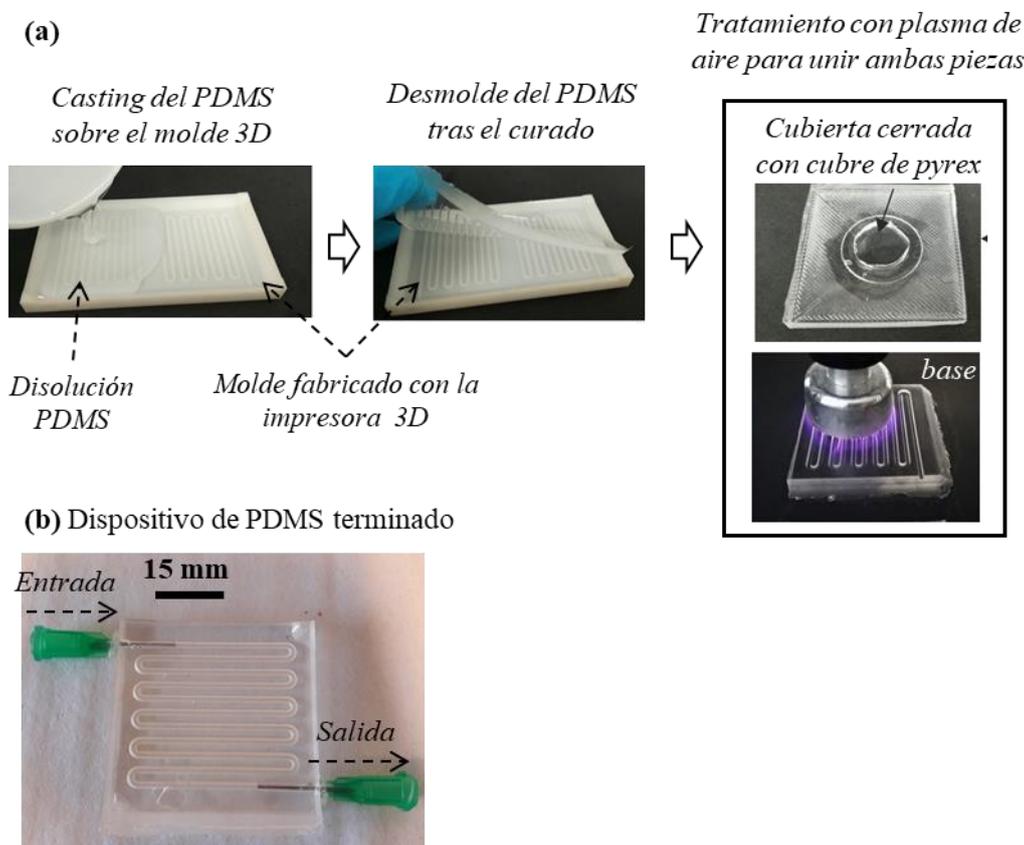


Figura 4.15 (a) Fabricación del dispositivo de PDMS mediante *casting* sobre soportes 3D preparados por impresión 3D y pegado mediante plasma de aire. (b) Dispositivo de PDMS sin la cubierta para poder observar el serpentín.

4.3.1.3 Síntesis *in-situ* de Au@POMs sobre los microdispositivos

La síntesis de las AuNP@POM se realizó directamente dentro de los microcanales del dispositivo de PDMS como indica la Figura 4.16. En primer lugar, se preparó una disolución *stock* 0,5 M de 2-propanol en agua destilada. Usando está disolución como solvente se preparó una disolución de H_{Au}Cl₄ 2 mM; otra 0,7 mM de H₃PW₁₂O₄₀ (PW), y, por último, una 0,7 mM de H₃PMo₁₂O₄₀ (PMo). A continuación, se mezclaron volúmenes iguales de la disolución de H_{Au}Cl₄ con la del correspondiente POM, y se desoxigena burbujeando una corriente de Ar durante 5 min. Esta mezcla se bombeó al dispositivo de PDMS con una velocidad de 1 mL/h, que se corresponde con un tiempo espacial de 0,21 h. La síntesis de las nanopartículas Au@POM sobre los microcanales de PDMS se induce irradiando los canales por donde circula la solución de precursores con una lámpara LED de longitud de onda 365 nm. La lámpara se colocó centrada sobre el

dispositivo de PDMS a una distancia de 25 mm alcanzándose una irradiancia de $4,5 \text{ mW cm}^{-2}$. Transcurridas 2 h se consideró que el dispositivo estaba completamente recubierto. En adelante los dispositivos SERS de PDMS recubiertos con nanopartículas estabilizadas con los POMs PMo y PW se denominarán AuNP@PMo y AuNP@PW, respectivamente.

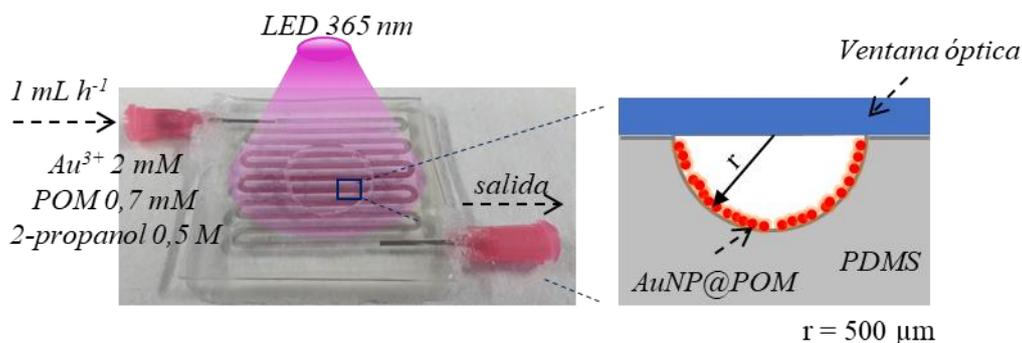


Figura 4.16 Síntesis de AuNP@POM y recubrimiento *in-situ* de los microcanales del dispositivo de PDMS final.

Se calculó el AEF de los diferentes sustratos SERS utilizando R6G como molécula patrón, y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2 (pág. 50), pero alimentando la disolución de R6G de manera continua con un caudal de $0,5 \text{ mL/min}$. Las condiciones de medida fueron $250 \mu\text{W}$ y 1 s de tiempo de integración para el dispositivo AuNP@PMo y $230 \mu\text{W}$ y $0,05 \text{ s}$ de tiempo de integración para el dispositivo AuNP@PW, en ambos casos se usó la longitud de onda de excitación de 785 nm y objetivo $20\times$.

Los experimentos de detección de paraoxon utilizando los dispositivos SERS se realizaron con el equipo Alpha 300 de sobremesa, la longitud de onda de excitación de 785 nm y el objetivo de $20\times$. La disolución de paraoxon se alimentó al dispositivo con un caudal de $0,5 \text{ mL/min}$ y siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.4.2, pág. 66. En general, y a no ser que se especifique lo contrario, las condiciones de medida en la detección de paraoxon fueron 1 s de tiempo de integración y una potencia de $1,2 \text{ mW}$ y $787 \mu\text{W}$ para los dispositivos AuNP@PMo y AuNP@PW, respectivamente. La descripción del resto de equipos y técnicas de caracterización utilizadas en la caracterización de los Ag nPlates y los sustratos SERS se incluyen en el Anexo I.

4.3.2 Resultados

4.3.2.1 Caracterización de los microdispositivos

El dispositivo final está formado por un microcanal con geometría de serpentín con una entrada y salida enfrentadas en diagonal y unas dimensiones totales de 40×40 mm y un grosor de 5 mm convirtiéndolo en un sistema de microfluídica flexible y compacto (Figura 4.15). El serpentín mantiene las dimensiones del molde 3D 1 mm de diámetro y $500 \mu\text{m}$ de profundidad y un volumen total de 210 mm^3 . La rugosidad promedio del dispositivo de PDMS, analizada con un perfilómetro, fue de 95 nm. Debido a las dimensiones de los microcanales la rugosidad fue medida en la parte superior de los mismos.

En las imágenes reales de los dispositivos (Figura 4.17) podemos observar que la síntesis y el recubrimiento se mantienen constante a lo largo del microcanal. En las imágenes SEM (Figura 4.17) se observa un recubrimiento homogéneo de las nanopartículas AuNP@PW y AuNP@PMo sobre el microcanal de PDMS con un porcentaje de recubrimiento del $27 \pm 3\%$ para AuNP@PW y $21 \pm 2\%$ para AuNP@PMo. En cuanto a la distribución de tamaños de las nanopartículas se calcularon unos valores de 89 ± 20 nm para AuNP@PW y 100 ± 27 nm para AuNP@PMo. Considerando que ambos POM tienen la misma estructura α -Keggin podemos asumir que el espesor del *shell* es igual y que por tanto el mayor tamaño de las nanopartículas AuNP@PMo lo atribuimos a la mayor actividad redox que tiene el PMo en comparación con el PW [356].

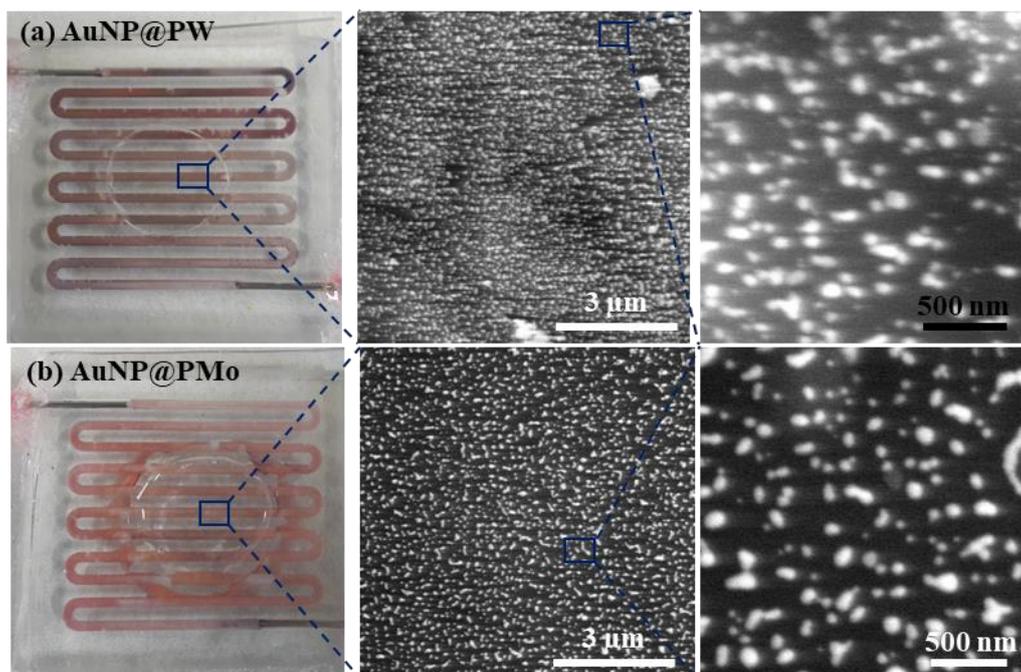


Figura 4.17 Imágenes reales e imágenes SEM de los dos dispositivos fabricados: (a) AuNP@PW y (b) AuNP@PMo.

La Figura 4.18a muestra la imagen TEM del corte transversal realizado al microcanal del dispositivo recubierto por AuNP@PW donde puede observarse que las nanopartículas tienen un tamaño similar y se encuentran ancladas a la superficie del canal. El grosor del *shell* de POM alrededor de las nanopartículas una vez ancladas al PDMS no pudo ser observado por TEM (Figura 4.18).

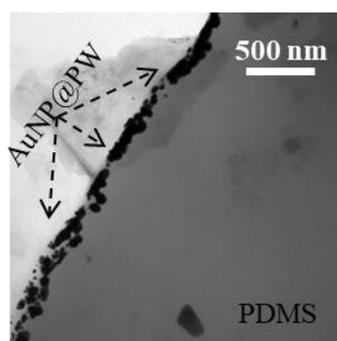


Figura 4.18 Imagen TEM del corte transversal del microcanal del dispositivo AuNP@PW.

El análisis por XPS (Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X) de los recubrimientos AuNP@POM sobre el PDMS confirmó la presencia de POM (Figura 4.19). Los dos picos característicos del Mo-3d, en estado de oxidación Mo^{VI} , a 232,9 y 236 eV del sólido puro $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$, se observan también en el Au@PMo. Sin embargo, los picos del W-4f que en el sólido puro $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ aparecen a 35,9 and 38,1 eV, se ven

desplazados hacia mayores energías de enlace indicando una fuerte interacción entre el Au y el PW. En ambos AuNP@POMs, la energía de enlace de las señales del Au 4f a 88,1 eV y 84,4 eV coinciden con las del Au⁰ indicando que el Au se encuentra en estado metálico en las estructuras híbridas [357]. La señal O-1s se deconvolucionó y ajustó a dos picos, uno a 530,5-531 eV que se corresponde con el enlace Mo-O_b y W-O_b presente en los POMs y otro a mayores energías de enlace 531,5-532 eV relacionado con los grupos -OH [358].

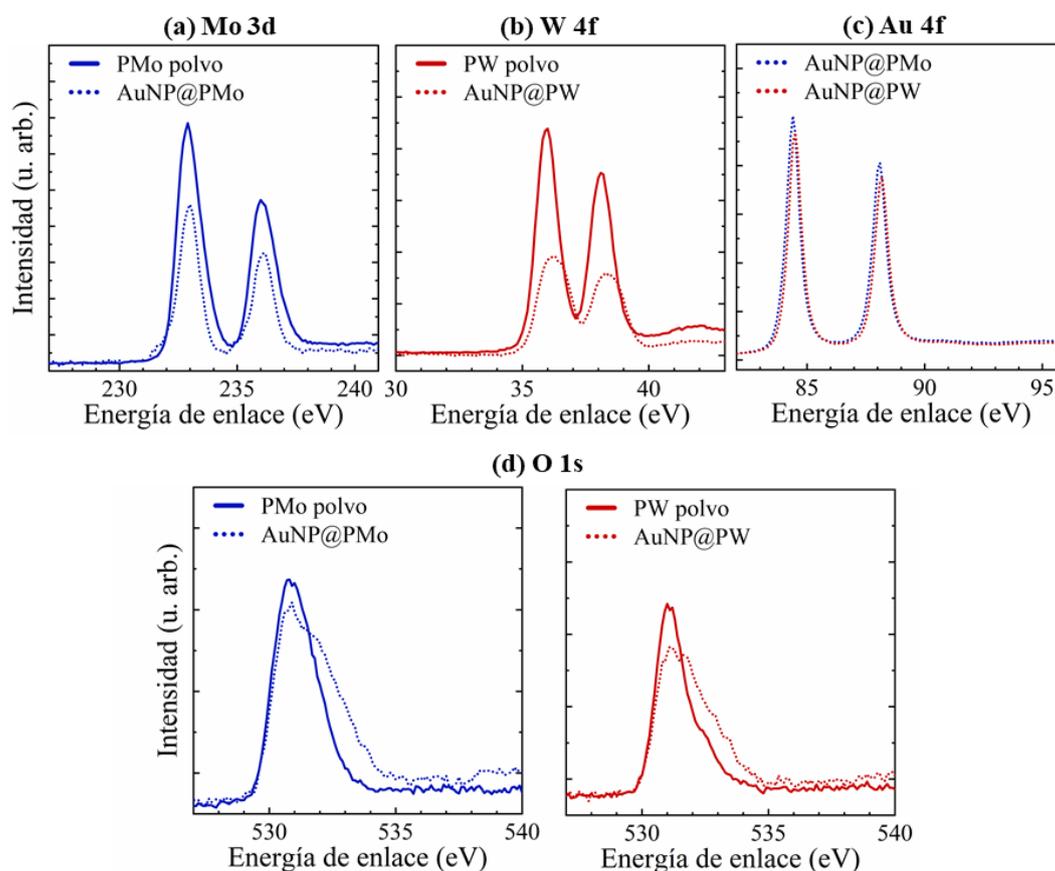


Figura 4.19 Análisis XPS de los dispositivos SERS AuNP@PW y AuNP@PMo, comparados con los POMs puros, para los picos (a) Mo-3d; (b) W-4f; (c) Au-4f y (d) O-1s.

Los espectros de absorción de los dispositivos SERS AuNP@PW y AuNP@PMo muestran una banda ancha centrada en 550-555 nm (Figura 4.20), consistente con el tamaño de partícula medido de las imágenes SEM, y con un cierto acoplamiento entre los momentos dipolares de partículas próximas que hace que se ensanche la banda [335], de hecho este ensanchamiento es mayor en el caso de AuNP@PW con un porcentaje de recubrimiento ligeramente superior.

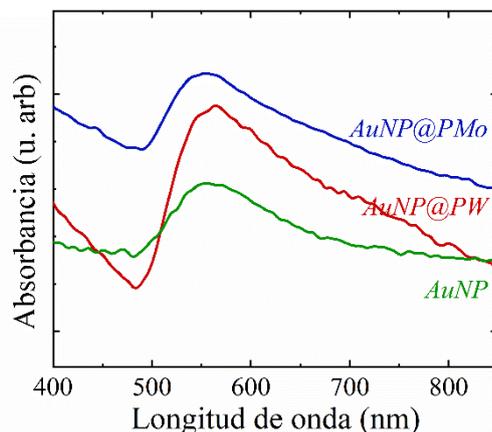


Figura 4.20 Espectro de adsorción UV-Vis de AuNP@PW, AuNP@PMo y AuNP.

4.3.2.2 Nucleación y crecimiento *in-situ* de Au@POMs en microdispositivos

Estos resultados de crecimiento *in-situ* de las nanopartículas AuNP@POM en la superficie de PDMS del microcanal sugieren que los núcleos de Au⁰ siguen un proceso de nucleación-crecimiento preferencial sobre las paredes del PDMS en lugar de en el seno de la fase líquida. El mecanismo propuesto es el siguiente: la luz ultravioleta induce la liberación de electrones por parte del 2-propanol que son transportados por los POMs hasta el Au³⁺ que se reduce a Au⁰. Estos Au⁰ se anclan a la superficie del microcanal mediante interacción Au-OH del grupo silanol del PDMS y posiblemente favorecida por la rugosidad de este. Posteriormente, el POM se ancla a la superficie desnuda del metal protegiéndola y formando la nanopartícula final AuNP@POM. Los experimentos expuestos a continuación nos ayudaron a confirmar esta hipótesis.

Para conocer la influencia del POM en la síntesis, se preparó un microdispositivo SERS en ausencia de POM, es decir, solo se irradió la disolución del precursor de oro con el 2-propanol, en adelante este dispositivo será denominado AuNP. La fotografía de la Figura 4.21 muestra que el recubrimiento sobre el PDMS es poco homogéneo presentando zonas con nanopartículas y otras sin recubrimiento de AuNP. Las imágenes SEM del dispositivo AuNP (Figura 4.21) muestran nanopartículas de menor tamaño y más polidispersas 65 ± 21 nm. Ésta mayor polidispersidad de las AuNP puede estar relacionada con el efecto estabilizador del POM alrededor de las nanopartículas AuNP@POM evitando la agregación de estas por repulsión electrostática. Todo esto se refleja en un SPR del dispositivo menos intenso y con el máximo a menores longitudes de onda que los dispositivos AuNP@POM (Figura 4.20, verde). Demostrando así que el

anclaje y nucleación de las semillas de Au^0 está favorecido por la nucleación heterogénea sobre la superficie rugosa del PDMS. La mayor densidad y tamaño de las nanopartículas de AuNP@POM en el recubrimiento, demuestran que la presencia del POM cataliza la reacción, aumentando la velocidad de transporte de electrones entre el 2-propanol y el Au^{3+} . Por otro lado, en este caso no se observaron nanopartículas de oro formadas en el seno de la disolución, en adelante $\text{AuNP@POM}_{\text{d}^{\text{on}}}$.

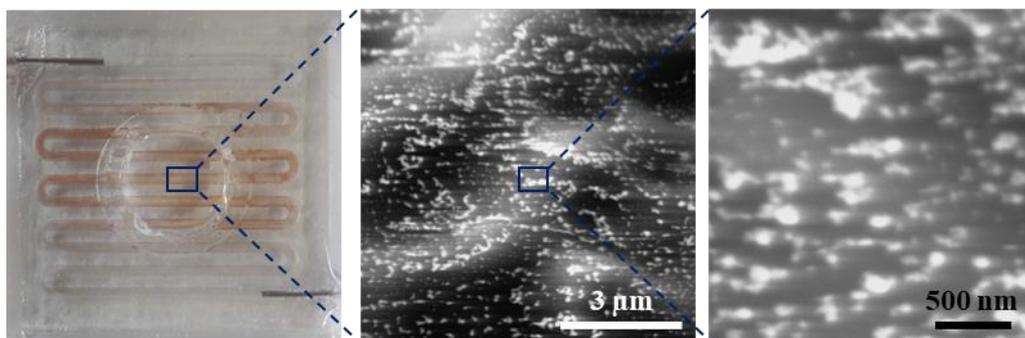


Figura 4.21 Imagen del dispositivo AuNP e imágenes SEM de uno de sus microcanales.

La pequeña fracción de $\text{AuNP@POM}_{\text{d}^{\text{on}}}$, formadas en el seno de la disolución cuando el POM está presente se analizó por microscopía STEM (Figura 4.22). Las $\text{AuNP@PW}_{\text{d}^{\text{on}}}$ y $\text{AuNP@PMo}_{\text{d}^{\text{on}}}$ tenían un tamaño similar 24 ± 6 nm y 29 ± 5 nm, respectivamente, pero menor que el de las AuNP@POM crecidas sobre las paredes del microcanal. Esto corrobora nuevamente, y como cabía esperar, que la nucleación heterogénea del Au^0 sobre la superficie del PDMS está favorecida respecto a la nucleación homogénea del Au^0 en disolución. El análisis STEM y EDS (Figura 4.22) nos permitió observar el *shell* de PW que rodea y estabiliza la AuNP@PW . El grosor es de alrededor de 1 nm correspondiente a una única molécula de POM alrededor del núcleo metálico [359].

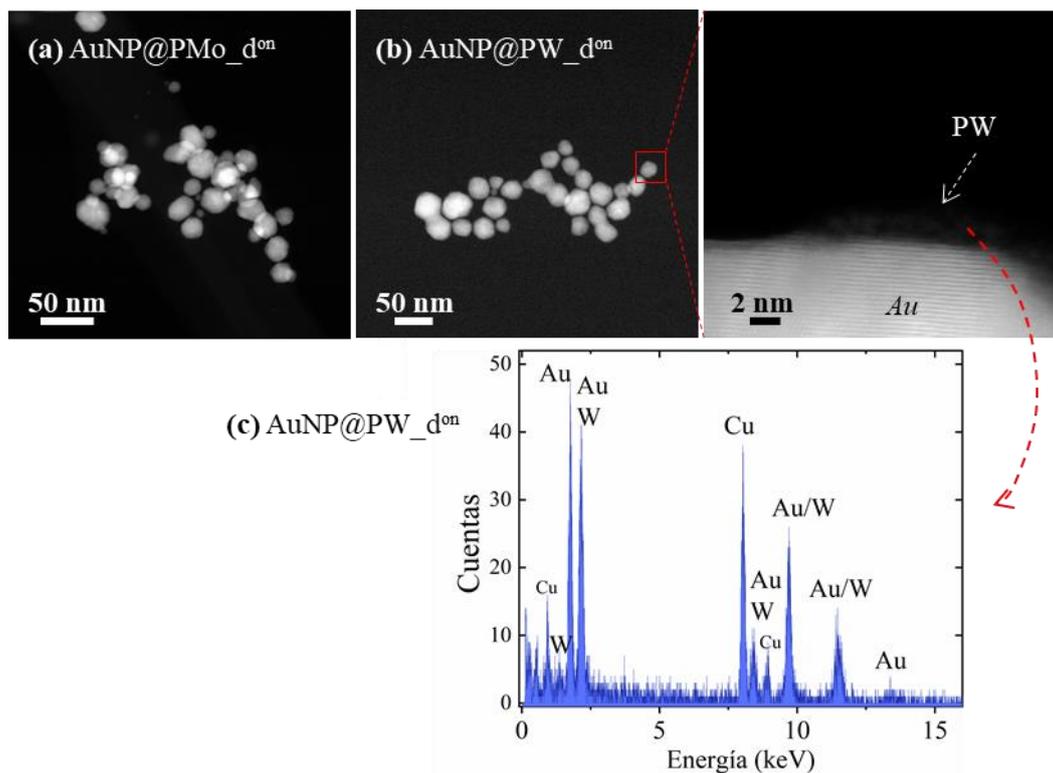


Figura 4.22 Caracterización de las AuNP@POM_{d^{on}} coloidales recogidas a la salida del dispositivo. **(a-b)** Imágenes STEM y **(c)** análisis EDS para corroborar la presencia del *shell* de POM.

Para confirmar el mecanismo de anclaje y crecimiento *in-situ* de las nanopartículas sobre la superficie, se preparó un dispositivo SERS alimentando las AuNP@POM_{d^{on}} ya formadas a los microcanales. Se alimentaron con el mismo caudal con y sin irradiación UV, y en ningún caso se consiguió recubrir el microcanal. Esto revela que no existe interacción entre el POM que recubre las nanopartículas y el PDMS de los microcanales. La formación *in-situ* de los núcleos de Au⁰ y anclaje sobre la superficie del PDMS no solo estaría favorecido por la rugosidad del PDMS (95 nm) sino también por las interacciones entre el Au y los -OHs terminales del PDMS. Los POMs son catalizadores ácidos [360] que favorecen la hidrólisis ácida del PDMS, aumentando el número de grupos -OH en la superficie del microcanal, y, por tanto, el número de puntos de anclaje Au-PDMS.

Estos resultados demuestran la nucleación preferencial del Au⁰ sobre el PDMS y que el POM tiene tres funciones en esta síntesis: *i*) transfiere electrones desde 2-propanol agente donador de electrones hacia los átomos de Au³⁺ a través de ciclos redox foto-inducidos por la luz UV; *ii*) actúa de estabilizante de las nanopartículas de oro formadas, y, *iii*) por repulsión electrostática evita la agregación de las partículas en fase líquida.

4.3.2.3 Comportamiento de los microdispositivos en espectroscopia Raman-SERS

La Figura 4.23 muestra el espectro SERS de los dispositivos AuNP@POM comparados con su respectivo POM puro, sólido. El modo vibracional metal (*M*)-oxígeno es la banda característica de los POMs. En el PW aparece a mayores desplazamientos Raman, 987 y 1010 cm^{-1} que para el PMo, 973 y 994 cm^{-1} , y representan el *stretching* antisimétrico y simétrico, respectivamente, del enlace $M = O_d$ [361]. Además de estos picos es posible apreciar las bandas menos intensas del enlace $M-O_b-M$ a 931 y 889 cm^{-1} para el PW y a 906 cm^{-1} para el PMo correspondientes al *stretching* antisimétrico de este enlace. También podemos observar que la intensidad del PMo es 10 veces menor que la del PW consistente con la menor capacidad de polarización de la nube electrónica por parte del PMo demostrada mediante análisis computacional DFT [356].

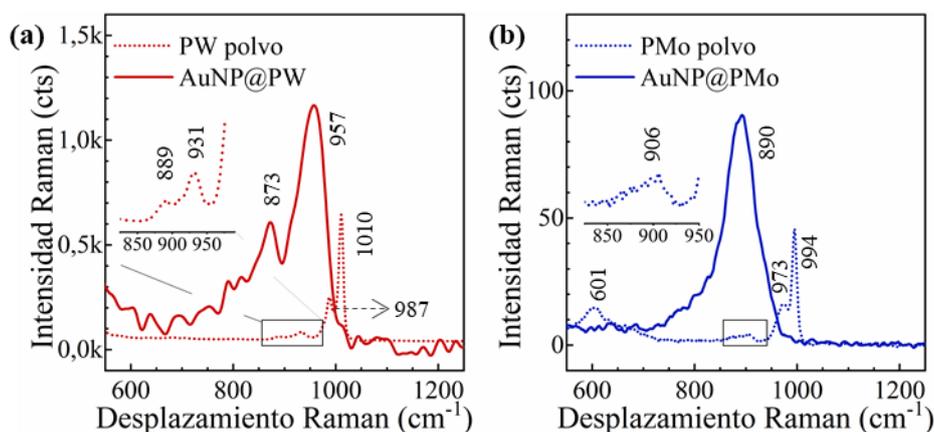


Figura 4.23 Espectro SERS de los dispositivos (a) AuNP@PW y (b) AuNP@PMo comparados con el espectro Raman del PW y PMo puros sólidos. Los insertos representan la magnificación del tramo 850-950 cm^{-1} de los POMs puros.

El espectro SERS de los dispositivos AuNP@POM indica un desplazamiento a menores frecuencias y un ensanchamiento de los picos respecto al espectro del Raman sólido. Esto es probablemente debido a la contribución de las bandas $M-O_b-M$ incrementadas por la interacción del POM y la AuNP. El desplazamiento y aumento de la banda $M-O_b-M$ está de acuerdo con lo observado por otros autores que proponen que la interacción entre el POM y la nanopartícula metálica se produce mediante una quimisorción a través de los oxígenos O_b [359]. En esta configuración, el POM se aproximaría perpendicular a la superficie de la nanopartícula maximizando la interacción entre los oxígenos O_b y el metal y quedando los oxígenos correspondientes al $M=O$ también muy próximos a la superficie [359,362].

La Figura 4.24 muestra los espectros SERS de la R6G 1 μM recogida sobre los tres dispositivos SERS preparados y donde puede observarse que la actividad SERS es mucho mayor sobre los dispositivos SERS AuNP@POM que sobre el dispositivo SERS AuNP. Entre los dos AuNP@POM, la intensidad de la R6G recogida sobre el dispositivo fabricado con PW es casi 10 veces mayor que la intensidad recogida sobre el dispositivo de PMo.

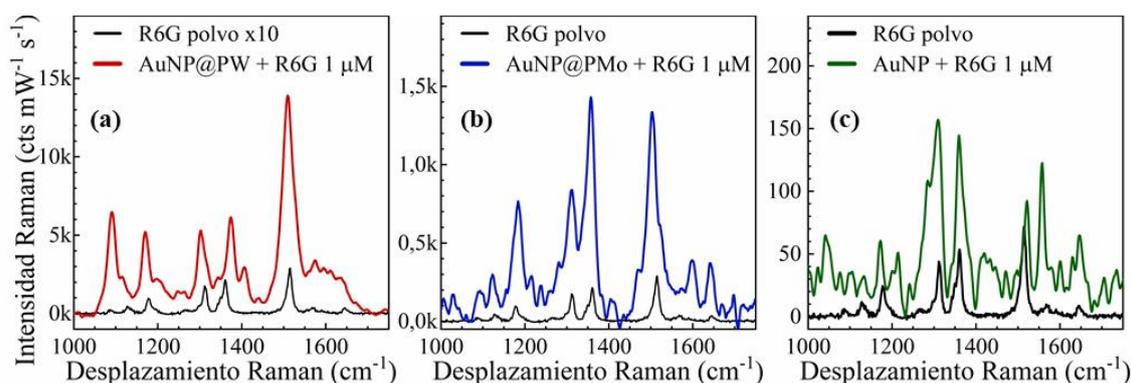


Figura 4.24 Espectro SERS de la R6G 1 μM recogido sobre los tres dispositivos preparados: (a) AuNP@PW, (b) AuNP@PMo y (c) AuNP comparados con el espectro Raman de la R6G puro sólido.

El cálculo del AEF se realizó con la intensidad promedio de 10 espectro medidos sobre cada uno de los tres dispositivos SERS. El valor de AEF aumenta desde $2,4 \times 10^5$ para AuNP, $3,6 \times 10^6$ para AuNP@PMo hasta $3,1 \times 10^7$ para AuNP@PW. Se ha encontrado que para nanopartículas de oro de 51 nm recubiertas con el POM $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$ el valor de AEF es $2,6 \times 10^5$ [354], inferior al alcanzado por nuestros dispositivos SERS AuNP@PMo y AuNP@PW. El AEF de las AuNP, $2,4 \times 10^5$, comparado con las AuNP@citrate, $9,2 \times 10^6$ (apartado 4.2.2.2, pág. 93), es un orden de magnitud menor. Probablemente, esta diferencia este debida a la menor densidad de recubrimiento obtenida con las AuNP sintetizadas sobre el dispositivo de PDMS.

Considerando que el tamaño de las nanopartículas es similar y aunque el porcentaje de recubrimiento es algo superior en el caso del PW y que ambos POMs tienen la misma estructura α -Keggin, la diferencia de AEF tiene que ser debida a las propiedades de W y Mo en la estructura del POM, y podría explicarse por la contribución del mecanismo de transferencia de carga (TC) al efecto SERS. El mecanismo TC puede contribuir en el efecto SERS hasta en un rango de 10 a 10^2 dependiendo de la naturaleza de la molécula y la interacción de esta con el sustrato SERS [35]. La mayor actividad SERS de los dispositivos AuNP@PW se puede atribuir a un mejor acoplamiento entre la *shell* de PW

y la nanopartícula de oro. La TC es más probable en moléculas que contienen electrones π en sus estructura, tales como la molécula aromáticas R6G usadas con ambos dispositivos SERS, y en aquellas moléculas en las que existe una mayor estabilización entre su HOMO-LUMO [363]. Mediante métodos computacionales DFT se ha demostrado que la diferencia entre el HOMO y el LUMO del PW es mayor que para el PMo, 2,8 eV y 2,03 eV [356], respectivamente. En resumen, las nanopartículas AuNP@PW cuentan con un sistema “núcleo plasmónico - *shell* de PW - R6G” en el que puede existir una TC entre la nanopartícula de oro, el LUMO del PW y de aquí al LUMO de la R6G haciendo que la intensidad Raman aumente en mayor medida que con el sistema que forman las nanopartículas AuNP@PMo.

A su vez, este mecanismo está favorecido por la eficiente adsorción de la R6G sobre el POM a través de interacciones electroestáticas, la superficie del POM está enriquecida en cargas negativas por sus grupos oxo terminales, por puentes de hidrógeno y por interacciones $M - O - - \pi$. La fuerza de estas interacciones fue estudiada en profundidad realizando ciclos adsorción/desorción de R6G en los dispositivos AuNP@POM. El experimento consistió en alimentar el dispositivo con una disolución 1 μM de R6G durante 10 minutos y a continuación limpiarlo con agua destilada, ambas con un caudal de 0,5 mL/min. La intensidad SERS del pico de R6G desplazado a 1516 cm^{-1} fue monitorizado durante 5 ciclos consecutivos adsorción/desorción de 10 min cada uno. La homogeneidad de la respuesta SERS en el dispositivo AuNP@PMo se muestra en la Figura 4.25a donde aparece la intensidad promedio de las 100 medidas que se hicieron en cada ciclo y que presentan una RSD menor al 20%. Por otra parte, la adsorción de la R6G sobre las nanopartículas AuNP@PMo es reversible y rápida puesto que en menos de 6 min se ha perdido completamente la señal de la R6G (ver Figura 4.25b). Esta propiedad de adsorción reversible de colorantes catiónicos del dispositivo AuNP@PMo podría usarse para aplicar estos dispositivos como sensores SERS de este tipo de contaminantes orgánicos.

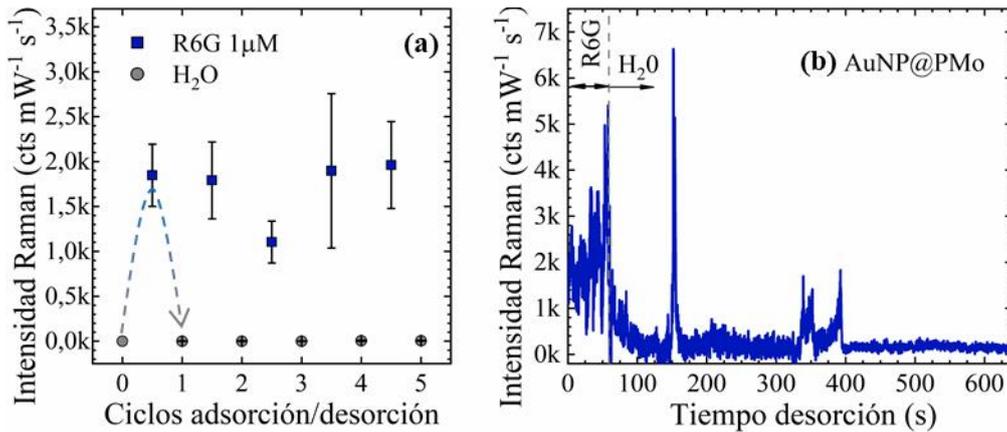


Figura 4.25 (a) Evolución de la intensidad SERS del pico de R6G a 1516 cm^{-1} en (a) cinco ciclos adsorción/desorción de una disolución $1\text{ }\mu\text{M}$ de R6G y (b) durante el primer ciclo de desorción de la R6G con agua en el dispositivo AuNP@PMo. La flecha describe un ciclo de adsorción/desorción de R6G. Las barras de error representan la desviación estándar.

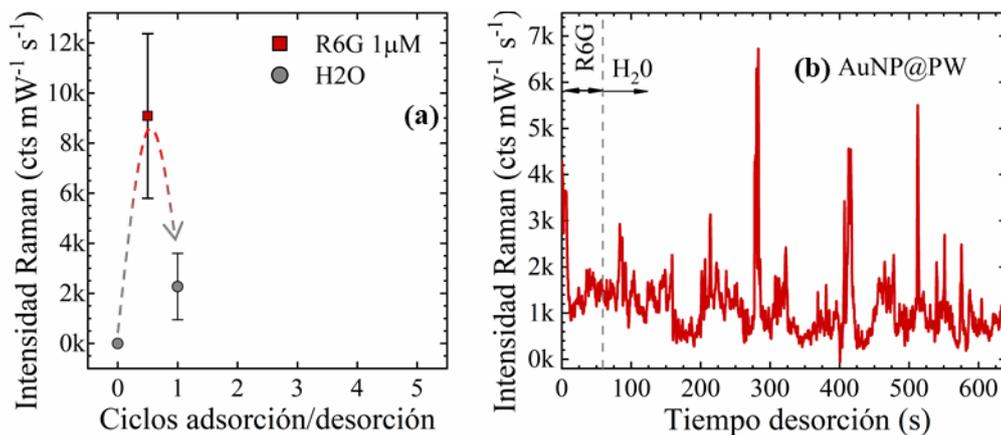


Figura 4.26 (a) Evolución de la intensidad SERS del pico de R6G a 1516 cm^{-1} en (a) cinco ciclos adsorción/desorción de una disolución $1\text{ }\mu\text{M}$ de R6G y (b) durante el primer ciclo de desorción de la R6G con agua en el dispositivo AuNP@PW. La flecha describe un ciclo de adsorción/desorción de R6G. Las barras de error representan la desviación estándar.

La señal promedio durante el primer ciclo de adsorción de R6G $1\text{ }\mu\text{M}$ sobre el dispositivo AuNP@PW es claramente superior a la obtenida con el dispositivo AuNP@PMo (ver Figura 4.25a y Figura 4.26a) pero también lo es su desviación estándar. En este caso, la adsorción de R6G es irreversible (Figura 4.26b) demostrando la fuerte interacción existente entre el PW y la molécula de R6G [364] que permite que el mecanismo de transferencia de carga *TC* entre las AuNP – PW – R6G sea más eficiente.

La homogeneidad de la señal a lo largo del canal se estudió midiendo en el canal central diferentes puntos a lo largo de 1200 μm (Figura 4.27). La RSD fue del 22% y del 23% para los microdispositivos AuNP@PMo y AuNP@PW, respectivamente.

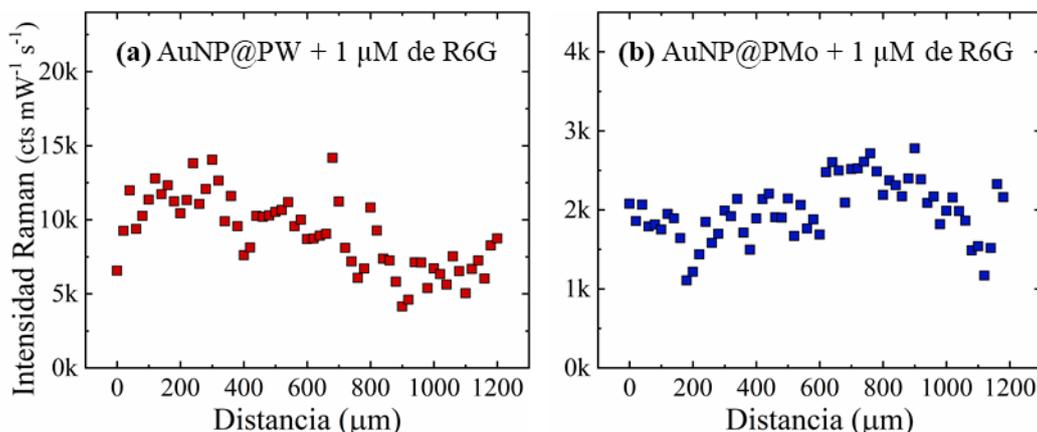


Figura 4.27 Evolución de la intensidad SERS del pico de R6G a 1516 cm^{-1} a lo largo de 1200 μm del canal central del microdispositivo (a) AuNP@PW y (b) AuNP@PMo.

4.3.2.4 Capacidad de detección de pesticidas en fase líquida

Las capacidades de detección de los dispositivos SERS AuNP@POM se estudiaron usando como analito paraoxon-metil. La disolución de paraoxon $1\text{ }\mu\text{M}$ se alimentó con un caudal continuo de $0,5\text{ mL/min}$ a los dispositivos.

La Figura 4.28 muestra los espectros SERS del paraoxon recogidos sobre los dos dispositivos AuNP@POM y comparados con la huella del paraoxon puro. En ambos casos, podemos observar que las bandas de los principales modos vibracionales del paraoxon aparecen ligeramente desplazadas a mayores frecuencias tras la interacción con las nanopartículas de AuNP@POM. La señal principal y correspondiente al *stretching* simétrico del grupo NO_2 (banda *b* de la Figura 4.28) se desplaza de 1346 cm^{-1} a 1368 cm^{-1} cuando interacciona con PW y PMo. La banda a 1228 cm^{-1} correspondiente al *stretching* del grupo P=O (banda *a*) se desplaza a 1258 y 1238 cm^{-1} , y la banda asociada a la vibración del anillo bencénico (banda *d*) se desplaza de 1590 cm^{-1} en el líquido puro a 1598 y 1623 cm^{-1} sobre los dispositivos AuNP@PW y AuNP@PMo, respectivamente. Finalmente, con el dispositivo AuNP@PW podemos llegar a detectar una última banda (banda *c*) correspondiente a la vibración asimétrica del grupo NO_2 y que aparece desplazada a 1520 cm^{-1} . La Tabla 4.2 resumen la asignación de bandas del paraoxon y el desplazamiento de estas cuando interaccionan con los microdispositivos AuNP@POM.

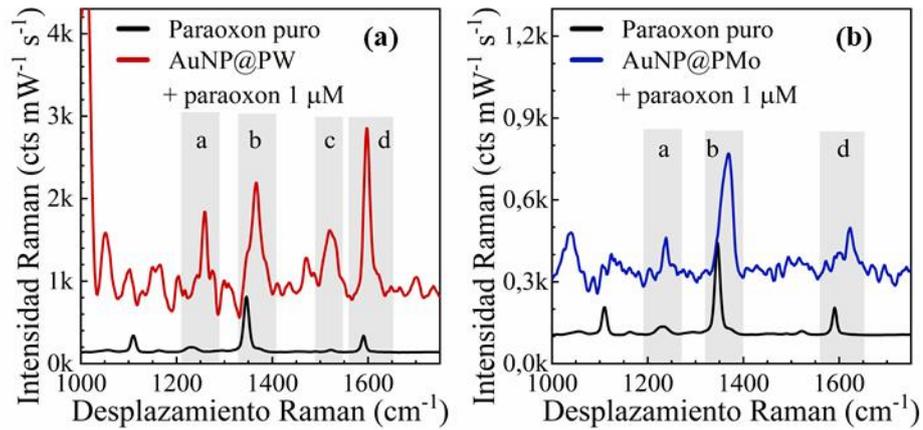


Figura 4.28 Espectro SERS de paraoxon-metil 1 μM alimentado con un caudal de 0,5 mL/min a los dispositivos (a) AuNP@PW y (b) AuNP@PMo. Las áreas sombreadas representan los modos vibracionales principales del paraoxon metil: *a* stretching P=O; *b* stretching de NO_2 ; *c* stretching asimétrico de NO_2 y *d* stretching anillo bencénico. Para una mejor visualización os espectros están desplazados en eje-y.

Tabla 4.2 Asignación de las bandas SERS mostradas en la Figura 4.28 durante la detección de paraoxon en los dispositivos AuNP@POM.

Banda	Desplazamiento Raman (cm^{-1})			Asignación [310]
	Paraoxon puro	AuNP@PW	AuNP@PMo	
a	1228	1258	1238	P=O <i>stretching</i>
b	1348	1346	1368	NO_2 <i>symmetric stretching</i>
c	1524	1520	-	NO_2 <i>unsymmetric stretching</i>
d	1590	1598	1623	Vibración del anillo

La reciclabilidad de los dispositivos SERS se estudió realizando tres ciclos de adsorción/desorción de paraoxon. Cada ciclo de adsorción/desorción consistió en 10 min pasando una disolución de paraoxon 1 μM , registrar la señal de 100 espectros a lo largo del microcanal, y a continuación, tras 10 min pasando agua y volver a registrar la señal para asegurar la completa desorción.

La intensidad SERS del paraoxon obtenida sobre el dispositivo AuNP@PW es claramente mayor a la obtenida con el dispositivo AuNP@PMo (Figura 4.29). Los valores de intensidad promedio de la banda desplazada a 1368 cm^{-1} , en el primer ciclo de medida, fueron $397 \pm 21 \text{ cts mW}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para AuNP@PMo y $1368 \pm 369 \text{ cts mW}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para AuNP@PW, esto se traduce en una desviación estándar de 5% y 27%, respectivamente.

En estas condiciones experimentales, se calculó el límite de detección, LOD, como tres veces la desviación estándar de la intensidad de la banda vibracional a 1368 cm^{-1} obteniéndose un LOD de $2,11 \times 10^{-7}\text{ M}$ ($52,1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) para el dispositivo AuNP@PMo y $1,67 \times 10^{-7}\text{ M}$ ($41,4\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) para el dispositivo AuNP@PW.

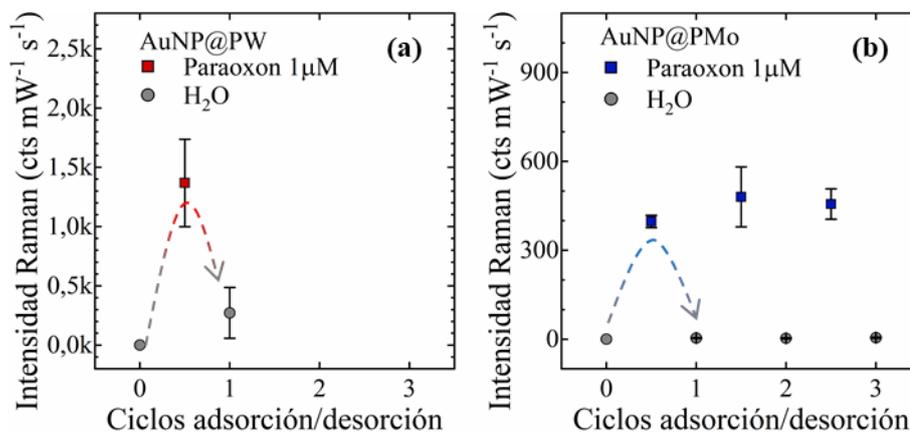


Figura 4.29 Evolución de la intensidad SERS del pico de paraoxon a 1368 cm^{-1} en tres ciclos adsorción/desorción de una disolución $1\text{ }\mu\text{M}$ de paraoxon/agua alimentadas por separado con un caudal $0,5\text{ mL/min}$ a los dispositivos (a) AuNP@PW y (b) AuNP@PMo. Las flechas indican el primer ciclo. Las barras de error representan la desviación estándar de 100 espectros.

Con estos resultados, y por analogía con los obtenidos con la R6G, podemos suponer que la adsorción del paraoxon es más fuerte sobre el PW haciéndola irreversible (Figura 4.30a). En el caso del AuNP@PMo se realizaron tres ciclos de adsorción/desorción de paraoxon en los que el dispositivo recupero la señal SERS inicial en menos de 2 minutos pasando agua destilada por los canales en todos los ciclos (Figura 4.30b). En el caso AuNP@PW no fue posible recuperar la señal (Figura 4.30a).

La interacción entre el PW y el paraoxon podemos estudiarla a través del desplazamiento de las bandas del paraoxon y de la intensidad relativa entre bandas. En este caso, la interacción podría tener lugar a través del anillo bencénico (banda *d* de la Figura 4.28) puesto que es la que mayor cambio de intensidad muestra. En literatura se han reportado este tipo de interacciones entre anillos aromáticos y POMs a través de anillos π deficientes [365] sustentando nuestra hipótesis.

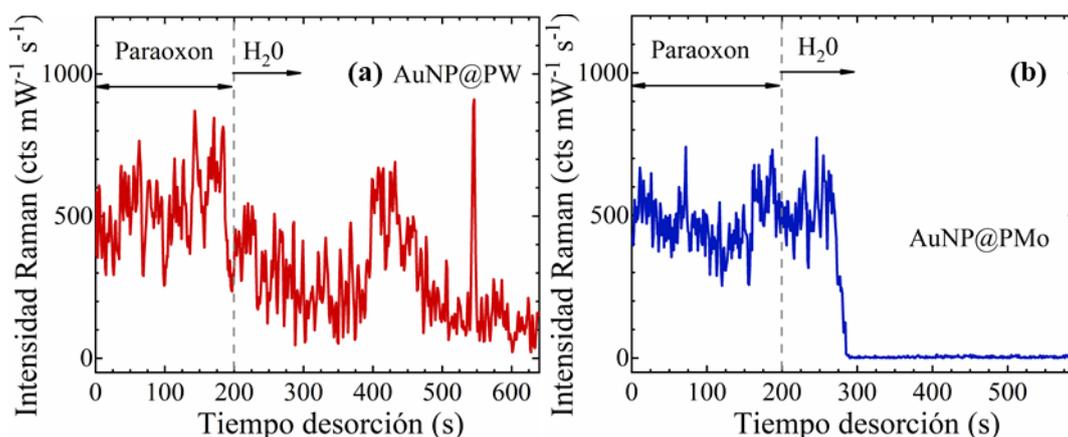


Figura 4.30 Evolución de la intensidad SERS del pico de paraoxon a 1368 cm^{-1} en durante el primer ciclo de desorción de paraoxon $1\text{ }\mu\text{M}$ con agua en el dispositivo (a) AuNP@PW y (b) AuNP@PMo.

4.4 CONCLUSIONES

En este capítulo han sido preparados dos sustratos SERS basados en nanopartículas de oro recubiertas de ligandos cargados negativamente: iones citrato y polioxometalatos.

El primer sistema fueron unas nanopartículas de oro recubiertas de iones de citrato que fueron sintetizadas y posteriormente depositadas mediante la técnica de capa-sobre-capas por interacciones electrostáticas a un soporte de SiO_2/Si . Este sencillo protocolo de deposición ha permitido preparar sustratos SERS homogéneos, reproducibles y robustos con unas distancias interpartícula de en torno a 10 nm , un factor de aumento analítico, AEF, de $9,2 \times 10^6$ y una desviación estándar del 15%.

Se ha demostrado que los ligandos estabilizantes de las nanopartículas juegan un papel crucial en el anclaje de los analitos a la superficie metálica. Los iones citrato anclaron las moléculas de DMMP en la fase gaseosa mediante un enlace reversible por puentes de hidrógeno. Esta interacción ha permitido detectar el DMMP en concentraciones hasta 625 ppbV y con un límite de detección teórico de 130 ppbV . La interacción con el citrato y las bajas concentraciones hicieron que algunas bandas del DMMP se desplacen ligeramente respecto al espectro puro. Además, los sustratos presentan un excelente tiempo de respuesta, 97 s , y una rápida y sencilla regeneración mediante un simple barrido de 25 min con una corriente de nitrógeno.

El segundo sistema ha consistido en nanopartículas de oro recubiertas de polioxometalatos (PMo y PW) sintetizadas y depositadas en una sola etapa en el interior

de microdispositivos compactos de PDMS. La síntesis está asistida por los polioxometalatos y favorecida por la nucleación preferencial del Au⁰ sobre la superficie del PDMS. Este protocolo de fabricación fácil, versátil, *in-situ* y de bajo coste ha permitido obtener recubrimientos homogéneos y con un tamaño de partícula menor a 100 nm a lo largo de todo el dispositivo de PDMS. Estos recubrimientos permitieron obtener señales SERS uniformes a lo largo de todo el microcanal y factores de aumento de hasta $3,1 \times 10^7$ para el dispositivo AuNP@PW y $3,6 \times 10^6$ para AuNP@PMo.

Las propiedades finales de los dispositivos AuNP@POM se vieron influenciadas por la naturaleza del POM. El dispositivo AuNP@PW alcanzó mayores amplificaciones de la señal debido a una interacción fuerte e irreversible entre el analito, R6G o paraoxon, y el *shell* de PW que favoreció la transferencia de carga entre la nanopartícula de oro y el analito. Por su parte, la señal Raman obtenida con el dispositivo AuNP@PMo es más estable, homogénea y reversible al tener una interacción más débil con los analitos estudiados. Los límites de detección obtenidos fueron $1,67 \times 10^{-7}$ M ($41,4 \mu\text{g L}^{-1}$) para el dispositivo AuNP@PW y $2,11 \times 10^{-7}$ M ($52,1 \mu\text{g L}^{-1}$) para el dispositivo AuNP@PMo.

Estos resultados demuestran las altas capacidades plasmónicas y de detección de las nanopartículas de oro recubiertas con ligandos que actúan como agentes de afinidad del analito. En particular, las mejores cualidades de los sustratos AuNP@citrato son su tiempo de respuesta y el límite de detección. La principal desventaja es la interferencia de los picos del citrato en el espectro del DMMP reduciendo la ventana espectral de detección.

Una de las mayores ventajas del sistema basado en AuNP@POM es que el “sustrato SERS” ya está integrado en microdispositivos SERS de bajo coste. Además, el diferente comportamiento de los dos POMs permite utilizar los dispositivos SERS en diferentes aplicaciones: el AuNP@PW en detección de compuestos a nivel traza por la mayor amplificación de la señal que consiguen y el AuNP@PMo en monitorización en continuo por la reversibilidad de su interacción.

Capítulo V

NANOPARTÍCULAS CORE-SHELL PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS

Resumen

En este capítulo desarrollamos dos plataformas SERS basadas en la combinación de nanopartículas plasmónicas con materiales adsorbentes. En la primera parte se sintetizan y estudian nanopartículas de sílice mesoporosa MCM48 sobre la que se han crecido nanopartículas de oro de 15 nm. Estas nanopartículas se depositaron dentro de chips de silicio compactos. Se caracterizaron las propiedades plasmónicas y adsorbentes alcanzándose un AEF de $1,17 \times 10^7$. El límite de detección experimental para el DMMP fue de 50 ppbV y el tiempo de respuesta 120 s. En la segunda parte se han sintetizado rods concéntrico Au@Ag recubiertos por ZIF8. Estos sustratos demostraron una alta sensibilidad detectando 50 ppbV de DMMP y 76 ppbV de CEES y unos tiempos de respuesta de 29 s y 54 s, respectivamente, medidos con el equipo portable. En ambas plataformas la homogeneidad de las nanoestructuras core-shell ha permitido que se pueda usar la señal de la MCM48 y del ZIF8 como patrón interno. De este modo, el ratio del analito frente al adsorbente ha sido usado para estandarizar todos los experimentos.

5 NANOPARTÍCULAS *CORE-SHELL* PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS

5.1 INTRODUCCIÓN

La detección directa de gases utilizando la tecnología SERS es compleja debido a la baja densidad del gas y al escaso número de moléculas por unidad de volumen, a bajas concentraciones, en comparación con la fase líquida. Además, en el caso de los agentes neurotóxicos estudiados en esta tesis existe una escasa afinidad entre ellos y las nanopartículas plasmónicas. En el capítulo anterior hemos aprovechado las interacciones electrostáticas y π - π entre los ligandos de afinidad, citrato y POM, respectivamente, para detectar los compuestos organofosforados.

En este capítulo la estrategia seguida ha sido desarrollar sensores SERS basados en la combinación de nanopartículas plasmónicas con adsorbentes. Los adsorbentes micro y mesoporosos son capaces de confinar las moléculas gaseosas cerca de las nanopartículas incluso sin tener una afinidad específica con el analito [51,178,366]. Para ello, hemos seleccionado dos materiales con diferente tamaño de poro: sílice mesoporosa MCM48 y materiales metal-orgánicos microporoso MOFs de sus siglas en inglés *metal-organic framework*. Ambos presentan una estructura porosa bien definida y una elevada superficie específica lo cual les confiere una alta capacidad de adsorción. En el desarrollo del sensor se estudiaron las propiedades adsorbentes, así como las propiedades plasmónicas de las nanopartículas, y finalmente, su capacidad para detectar gases neurotóxicos y lacrimógenos en bajas concentraciones.

5.1.1 Sílice mesoporosa MCM-48

Un material mesoporoso es un material formado por poros de un diámetro entre 2 y 50 nm [367]. Los primeros materiales mesoporosos de sílice fueron sintetizados en 1971 [368]. Posteriormente, en 1992, se introdujo la utilización de estructurantes, *templates*, para generar mesoporos ordenados, recibieron el nombre genérico de M41S y se clasificaron según el tamaño de sus poros [369]. Entre ellos se encuentra la MCM48 que

presenta una red cúbica de poros interconectados separados por paredes de SiO₂ [370] (Figura 5.1a).

Como hemos comentado en el Capítulo 1 las nanopartículas híbridas sílica-metal plasmónico han sido aplicadas en distintos tipos de sensores [264]. Por ejemplo, nanopartículas de oro recubiertas de sílica mesoporosa han sido utilizadas para detectar hasta 100 ppbV de 2,4-nitrotolueno (DNT) en menos de 3 min [265]. La combinación contraria (SiO₂ *core* – Au/Ag *shell*) ha sido utilizada para concentrar e identificar el fungicida thiram en bajas concentraciones, 12 ng/L [251]. En literatura también podemos encontrar trabajos donde sobre una sílice densa crecen una *shell* compacta de oro [371–373], lo cual hace que se pierdan las propiedades de adsorción de la sílice. Finalmente, la sílice mesoporosa también se ha utilizado para la adsorción y descontaminación de agentes neurotóxicos organofosforados [374].

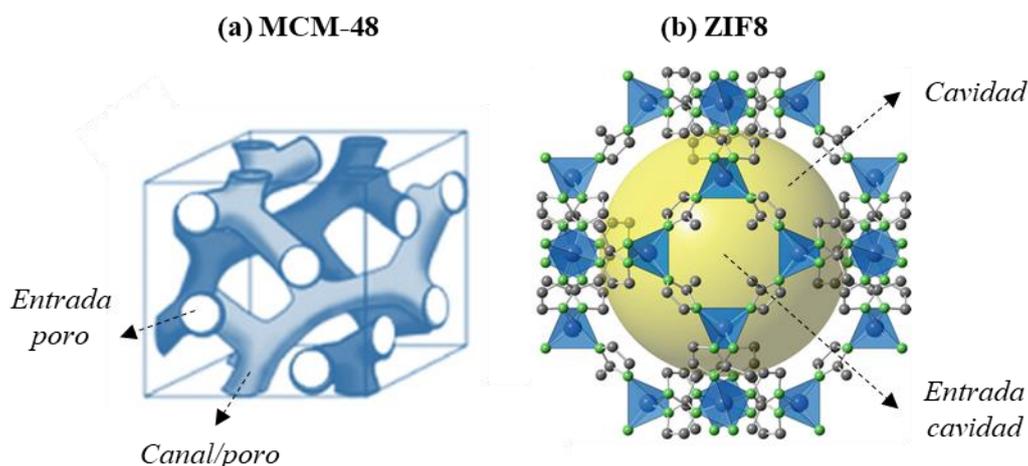


Figura 5.1 Representación gráfica de la sílice mesoporosa MCM48 (a) y del ZIF8 (b). Adaptados de [375] y [376], respectivamente.

5.1.2 Materiales metal-orgánico estructurados

Un material microporoso es un material formado por poros de un diámetro menor a 2 nm. Según la composición de su estructura los podemos dividir en tres grandes familias: *i*) materiales microporosos inorgánicos, zeolitas o aluminosilicatos; *ii*) materiales microporosos híbridos orgánico-inorgánicos, estructuras metal-orgánicas MOFs, y *iii*) materiales microporosos orgánicos, COFs de sus siglas en inglés *covalente organic frameworks*.

Los MOFs son sólidos metal-orgánicos cristalinos y porosos formados por la unión covalente coordinada de iones o clústers metálicos y moléculas orgánicas, denominadas ligandos, dando lugar a moléculas neutras. Estos materiales se caracterizan por poseer grandes volúmenes de poro y elevadas áreas superficiales [377,378].

En el año 2006, se reportaron por primera vez los *zeolite imidazolate frameworks* (ZIF) [379], un subgrupo de MOFs caracterizados por poseer topologías zeolíticas y por el uso de grupos imidazolato como ligandos orgánicos. Estos compuestos presentan topologías zeolíticas porque los metales (Zn, Co, etc) están coordinados por los átomos de nitrógeno del imidazolato o sus derivados, formando un ángulo metal-imidazolato-metal similar al ángulo Si-O-Si comúnmente encontrado en las zeolitas, 145° [379,380]. Es importante mencionar que los poros de los ZIFs son, aproximadamente, dos veces más grandes que los de las zeolitas correspondientes [379,381]. Entre estos se encuentra el ZIF-8 formado por núcleos de Zn interconectados por 2-metilimidazol formando la topología de la sodalita, grandes cavidades de alrededor de 11 \AA interconectadas por pequeñas aperturas de $\sim 3,5 \text{ \AA}$ [379]. La distancia entre las cavidades es de alrededor de 15 \AA [376], ver Figura 5.1b. Se caracteriza por su elevada resistencia química y térmica [379].

Diferentes MOFs han sido utilizados para la adsorción y descontaminación de agentes de guerra química [382–386]. Recientemente, 2018 y 2019, nanocubos de plata recubiertos por capas de ZIF8 han sido utilizados para detectar hasta 50 ppbV de moléculas grandes, 2-naftalenotiol [178] y 4-metilbencenotiol [366]. También han sido empleados en la detección de pesticidas en fase líquida donde recubriendo nanohilos de Ag han sido capaces de detectar $24 \mu\text{g/L}$ de thiram [387].

5.2 SÍLICE MESOPOROSA RECUBIERTA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS USANDO CHIPS DE MICROFLUÍDICA⁸

5.2.1 Procedimiento experimental

5.2.1.1 Materiales

Ácido cloroaúrico (HAuCl_4 , ~ 50% básico), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, $\geq 99\%$), tetraetil ortosilicato (TEOS, 98%), copolímero Pluronic® F127 (F127), 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES, 98%), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de tetrakis(hidroximetil)fosfonio (THPC, 80%), carbonato de potasio (K_2CO_3), formaldehído (37%), hidróxido de amonio (NH_4OH , 28-30% NH_3), ácido clorhídrico (HCl, 37%), rodamina 6G (R6G) y metilfosfonato de dimetilo (DMMP, 97%) se compraron en Sigma Aldrich y se usaron como se recibieron. El tolueno, diclorometano (CH_2Cl_2) y dietiléter se adquirieron en Fisher Chemical y el hidróxido de potasio (KOH) y el etanol absoluto en PanReac AppliChem. La fotoresina ProTEK PSB fue adquirida en Brewer Science y la TI35ESX en Microchemicals. La silicona adhesiva Silcoset 158 fue comprada en ACC Silicones. Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada. Las obleas de silicio con 1 μm de óxido de silicio térmicamente depositado (SiO_2/Si) se adquirieron en SilTronix. Obleas de Borofloat de 500 μm .

5.2.1.2 Síntesis de las nanopartículas de oro (Au@MCM)

La preparación de las nanopartículas de sílice recubiertas de nanopartículas de oro, Au@MCM y Au@Stöber, incluye tres pasos (Figura 5.2). El primer paso es la síntesis de las nanopartículas de sílice mesoporosa, MCM48, o densa, Stöber, seguida de su funcionalización con grupos amino. La segunda etapa es la síntesis de las semillas de oro,

⁸ El contenido de este capítulo ha sido adaptado de la siguiente publicación científica:

M. Lafuente, F. Almazán, E. Bernad, M.A. Urbiztondo, J. Santamaría, R. Mallada, M.P. Pina.

“SERS detection of neurotoxic agents in gas phase using microfluidic chips containing gold-mesoporous silica as plasmonic-sorbent”

Transducers 2019 – EUROSENSORS XXXIII, 2019. DOI: 10.1109/TRANSDUCERS.2019.8808289

Au-semillas, y su anclaje sobre la superficie de la sílice aminada. Y el último paso es el recrecimiento de las semillas de oro hasta formar nanopartículas.

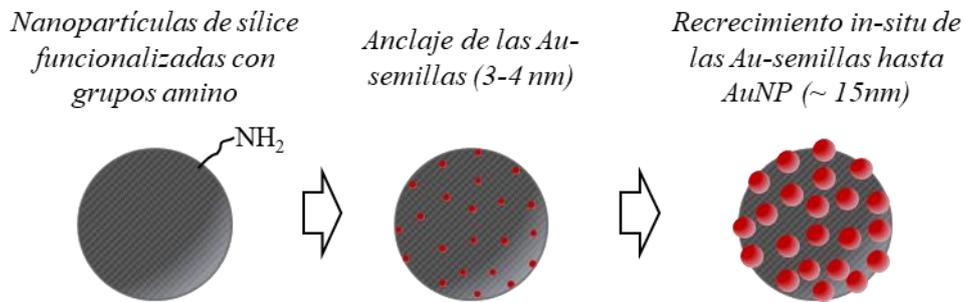


Figura 5.2 Esquema de las tres etapas de la preparación de las nanopartículas Au@MCM y Au@Stöber.

A continuación, se detallan cada uno de los pasos:

- Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa, MCM48

Las nanopartículas esféricas de MCM48 fueron sintetizadas modificando un protocolo previo [370]. Para ello, 0,5 gr de CTAB y 2 gr de F127 fueron mezclados en 95 mL de agua destilada. Una vez disueltos, a temperatura ambiente se añaden 43 mL de etanol absoluto y 11,5 mL de NH_4OH . Finalmente, se añaden 1,93 mL de TEOS. La síntesis se mantiene durante 4 h bajo una velocidad de agitación magnética de 650 rpm. Tras este tiempo, la mezcla se deja reposar en oscuridad y sin agitación durante 24 h para que la sílice termine de condensar. El precipitado blanco fue recuperado por centrifugación, lavando tres veces con etanol absoluto y dejando secar a 70°C . El surfactante ocluido en los poros fue eliminado mediante calcinación a 550°C en aire durante 6 h (rampa de calentamiento $1^\circ\text{C}/\text{min}$).

- Síntesis de nanopartículas de sílice densa, Stöber

Esta síntesis está basada en el conocido proceso de Stöber [388]. En resumen, 3 mL de NH_4OH y 1,5 mL de TEOS se añaden a 50 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente y bajo agitación magnética. La suspensión cambia de incolora a blanca en 270 min.

- Funcionalización de las nanopartículas de sílice

El protocolo de funcionalización de la sílice es el mismo para la sílice mesoporosa que para la densa [389]. 300 mg de nanopartículas de sílice fueron añadidos a 15 mL de

tolueno en un matraz de tres bocas bajo una agitación de 400 rpm. Se desplaza el aire haciendo pasar una corriente de argón durante 15 min. Tras este tiempo, el matraz se sumerge en un baño de aceite a 100°C. Cuando la mezcla ha alcanzado esta temperatura, se añaden 150 µL de APTES y se mantiene las condiciones durante 1 h a reflujo. El producto, un sólido blanco, se filtra a vacío y se lava con una mezcla de diclorometano/dietiléter (1:1 v/v) y se deja secar durante 12 h a 50 °C. Estas nanopartículas se denominarán amino-MCM y amino-Stöber.

- Síntesis de semillas de oro (Au- semillas)

Las semillas de oro, en adelante Au- semillas, fueron sintetizadas basándonos en protocolos previos [390]. Brevemente, 1 mL de THPC (12 µL de THPC en 1 mL de agua destilada) y 0,5 mL de NaOH (1 M) fueron añadidos a 50 mL de agua destilada a temperatura ambiente y bajo agitación magnética. Tras 5 min, se añaden 2,5 mL de una disolución de HAuCl₄ 1% wt. La disolución cambiará de incolora a marrón y a partir de entonces se mantiene 10 min en agitación. La dispersión de Au- semillas se almacena a 4°C y un máximo de 7 días.

- Anclaje de Au- semillas a las nanopartículas de sílice funcionalizadas

10 mL de la suspensión de Au- semillas y 1 mL de la suspensión de amino-MCM (17,5 mg/mL en etanol absoluto) fueron mezclados y el pH fue ajustado a 2,5 añadiendo HCl diluido. La suspensión se mantuvo a temperatura ambiente y oscuridad durante 2 h. Tras este tiempo las nanopartículas se habrán decantado, esto es indicativo de que el anclaje se ha efectuado correctamente. El producto se lava por centrifugado, 3 veces a 4000 rpm durante 20 min, y se redispersa en 5 mL de agua destilada. La suspensión final es de color rojo/granate y puede almacenarse varias semanas a 4 °C. También se prepararon los ratios Au- semillas/amino-MCM 6:1 y 3:1 durante el proceso de optimización de la síntesis.

- Crecimiento de las Au- semillas sobre la superficie de la sílice aminada

Para el recrecimiento de las Au- semillas hasta nanopartículas de oro, se prepara una disolución acuosa de [AuCl(OH)₃] mezclando 25 mg de K₂CO₃ con 1,5 mL de HAuCl₄ (1% en peso) en 100 mL de agua destilada y se mantienen en agitación magnética durante 30 min. Tras este tiempo, en un matraz de 10 mL en un baño de hielo se añaden 4 mL de esta disolución, 146 µL de las Au- semillas ancladas a la sílice aminada y 10 µL de

formaldehído como agente reductor. El tiempo óptimo de recrecimiento fue 50 min bajo agitación magnética de 300 rpm. Inmediatamente después las Au@MCM se centrifugan a 2500 rpm durante 15 min y el sólido se redispersa en 1 mL de agua destilada. La suspensión final tendrá un color morado y puede almacenarse varios meses.

5.2.1.3 Fabricación del chip de microfluídica como sustrato SERS

La Figura 5.3a nos muestra un esquema general de la fabricación del chip de microfluídica utilizado como sustrato SERS. Se fabricaron cinco dispositivos de microfluídica. Cada chip está formado por un microcanal de 5 mm × 33 mm fabricado siguiendo un protocolo previo de nuestro grupo [391]. En resumen, el proceso de fabricación consiste en un grabado húmedo anisotrópico del silicio <100> hasta alcanzar una profundidad de 40 μm. Para ello, en primer lugar, se realizó una fotolitografía óptica con los motivos deseados utilizando la resina ProTEK PSB. Posteriormente, se realizó el grabado con KOH al 40% (peso/volumen) a 80 °C y por 40 min (velocidad de ataque ≈ 1000 nm/min). La profundidad del canal fue analizada por perfilometría.

En el dorso del microchip se acoplaron unas pistas de oro para poder calentar y regenerar el chip *in-situ*. Previamente para aislar eléctricamente las pistas conductoras de Au se evaporó por haz de electrones sobre la superficie de silicio 200 nm de Al₂O₃. Se realizó un proceso de litografía *lift-off* con la resina TI35ESX y se depositó mediante evaporación por haz de electrones una capa 150 nm de Au. Los chips se cortaron en piezas de 20 mm × 45 mm (Figura 5.3b).

Las diferentes nanopartículas se depositaron dentro del canal mediante *spin coating* de sus suspensiones en etanol. La suspensión de Au@MCM se concentró hasta un 0,15% en peso. El protocolo de espineado consta de dos etapas: i) 15 s a 300 rpm; ii) 60 s a 1000 rpm. El protocolo se repitió 10 veces dispersando en cada una de ellas 25 μL. Para evitar adhesión de nanopartículas fuera del canal se recubrió el chip con un adhesivo que tras el espineado fue retirado.

Finalmente, el microchip fue cerrado por *anodic bonding* con una oblea de 500 μm de Borofloat aplicando 1000 V a 350 °C. La entrada y salida se mecanizaron con usando una pistola de arena y para el acceso se colocaron capilares de sílice sobre septum pegados mediante la silicona adhesiva Silcoset 158.

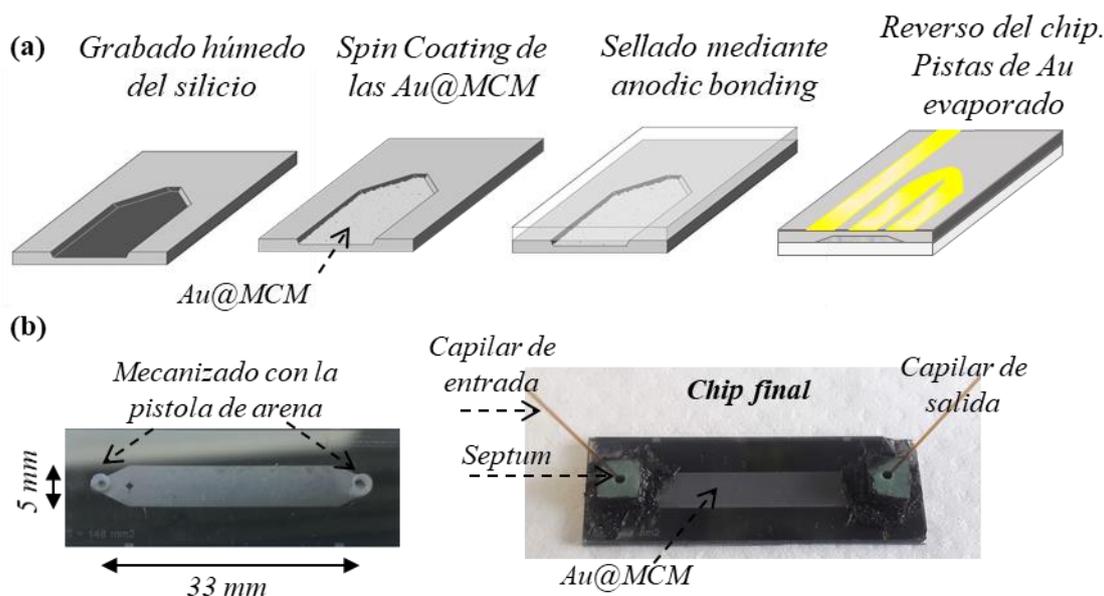


Figura 5.3 (a) Esquema de fabricación de los microchips de silicio usados como soporte SERS. (b) Imágenes reales de los chips finales.

Se calculó el AEF del sustrato SERS utilizando R6G como molécula patrón. Las medidas para calcular el AEF y los experimentos de detección de DMMP a diferentes concentraciones se realizaron con el equipo Alpha 300 de sobremesa. En general, y a no ser que se especifique lo contrario, las condiciones de medida en la detección de DMMP fueron una potencia del láser de 0,1 mW, la longitud de onda de excitación de 785 nm, objetivo del microscopio 20x, tiempo de adquisición 1 s y una acumulación. La dosis irradiada sobre la muestra fue de $0,034 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$. Por su parte, el resto de los experimentos de detección de DMMP se realizaron con el equipo portable BWTEK, una potencia de 350 mW y 2 s de tiempo de integración. La dosis irradiada sobre la muestra fue de $0,044 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$.

5.2.1.4 Experimentos de adsorción de DMMP

Los experimentos de adsorción de DMMP en los microchips fueron realizados en colaboración con el Dr. Fernando Almazán del grupo NFP de la Universidad de Zaragoza.

Para evaluar las propiedades de adsorción, los diferentes materiales fueron expuestos a una atmósfera saturada de DMMP. Para ello, las nanopartículas de MCM48, amino-MCM48 y sílice densa fueron secadas en una estufa a 80°C durante 24 h. Después, se colocaron en un desecador hermético de vidrio de 2,5 L junto con el DMMP en fase líquida durante 24h, tiempo que se consideró suficiente para alcanzar el equilibrio de

adsorción. Para evitar la interferencia de la humedad ambiental, la parte inferior del desecador se rellenó de gel de sílica. A la temperatura ambiente de 20 °C, la presión de vapor del DMMP es 77 Pa [392], y se corresponde con una concentración de DMMP de 747 ppmV (3803 mg/m³) en la fase gas. Una alícuota de cada uno de los materiales fue analizada por termogravimetría (TGA).

Asimismo, se realizaron experimentos de adsorción en continuo y a temperatura ambiente para obtener una curva de ruptura en los microchips. La curva de ruptura se define como la curva obtenida al representar la concentración del adsorbato a la salida del lecho adsorbente en función del tiempo. Los vapores de DMMP se generaron usando un tubo de permeación (VALCO, velocidad de permeación 1629.96 ng/min \pm 0.71% a 100 °C) y se arrastraron con una corriente de N₂ de 10 mL/min. Se evaluó una concentración de 3 ppmV (17 mg/m³) diluyendo con una segunda corriente de N₂. Los gases a la salida del microchip se analizaron en continuo en un cromatógrafo de gases (Shimadzu GCMS-QP2010). El material adsorbente se regeneró a 200 °C con una corriente seca de N₂ a 10 mL/min.

5.2.1.5 Simulación por el método FDTD del campo electromagnético

La amplificación del campo eléctrico sobre las Au@MCM fue simulada usando el método computacional FDTD a través del software comercial (Lumerical Solutions Inc., Ansys). Las dimensiones de las nanopartículas Au@MCM se determinaron a partir de las imágenes de TEM. Las simulaciones 3D se realizaron considerando las nanopartículas de MCM48 como una superficie 2D sobre las que se colocan las nanopartículas de oro como esferas 3D de Au. Esta aproximación permitió reducir de manera apreciable el tiempo de computación. El mallado mínimo fue de 0,15 nm. Se consideraron las condiciones de contorno absorbentes PML (*Perfectly matched layer*). Idealmente, PML absorbe toda la luz sin crear ningún reflejo. La fuente de excitación fue una onda plana de longitud de onda 785 nm que se propaga en el eje-y con el campo eléctrico paralelo al eje-x. Se realizaron test de convergencia para determinar la distancia óptima entre la nanopartícula y las condiciones de contorno PML. La constante dieléctrica del oro y del SiO₂ fue extraída de los datos tabulados por Palik [40].

5.2.2 Resultados

5.2.2.1 Caracterización de las nanopartículas Au@MCM

La preparación de las nanopartículas de sílice recubiertas de AuNP, Au@MCM, consta de tres etapas, ver Figura 5.2, pág. 129. Las nanopartículas de MCM48 esféricas se sintetizaron controlando la velocidad de agitación y el ratio molar entre la fuente de sílice y el surfactante. El bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) fue utilizado como estructurante-surfactante, el tetraetil ortosilicato como fuente de silicio y como agente de dispersión de las nanopartículas se utilizó Pluronic® F127. El rendimiento de la síntesis de las nanopartículas de MCM-48 fue de un 87%. Se obtuvieron partículas esféricas de diámetro 180 ± 9 nm, determinado por imágenes de TEM ($N > 200$). En la imagen TEM de la Figura 5.4a se pueden observar los poros de la MCM48. El análisis de la isoterma de adsorción de nitrógeno (Figura 5.4b-c), dio como resultado una superficie específica BET de $1230 \text{ m}^2/\text{gr}$ y un diámetro de poro de 3,5 nm, según el análisis BJH.

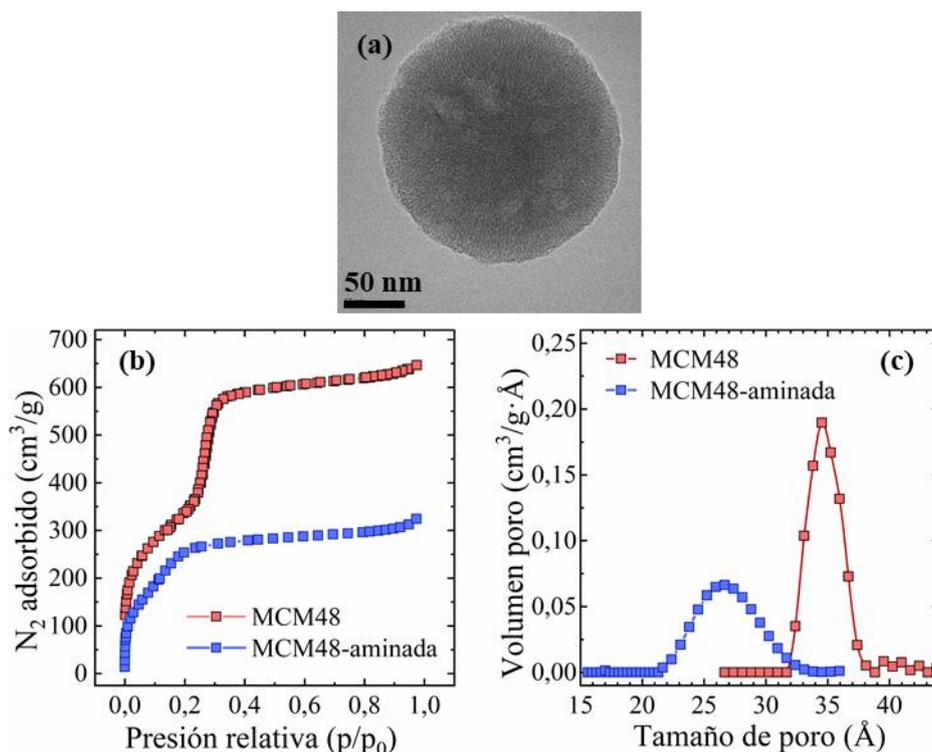


Figura 5.4 (a) Imagen TEM de una nanopartícula de sílice MCM48. (b) Isotherma de adsorción-desorción de N₂ de la MCM48 antes y después de aminorar y (c) tamaño de poro de estas.

La siguiente etapa es la funcionalización de la MCM48 con grupos amino usando 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES). Esta amino funcionalización es crucial para el

anclaje por interacciones electrostáticas de las semillas de Au a la superficie de la MCM48. El espectro FTIR de la MCM48 antes y después de la funcionalización con APTES aparece en la Figura 5.5a. La banda a 3750 cm^{-1} corresponde a los grupos -OH del silanol y prácticamente desaparece tras la funcionalización. Al mismo tiempo, aparece una banda intensa entre $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de los enlaces $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-H}$ y $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ de la molécula de APTES. Además, también se observa tras la funcionalización con APTES la vibración del enlace N-H del grupo amino a 3382 cm^{-1} y 1479 cm^{-1} . Tras la amino-funcionalización la superficie específica BET disminuyó hasta $870\text{ m}^2/\text{gr}$ (Figura 5.4b) y el diámetro de poro a $2,6\text{ nm}$ (Figura 5.4c), según el análisis BJH.

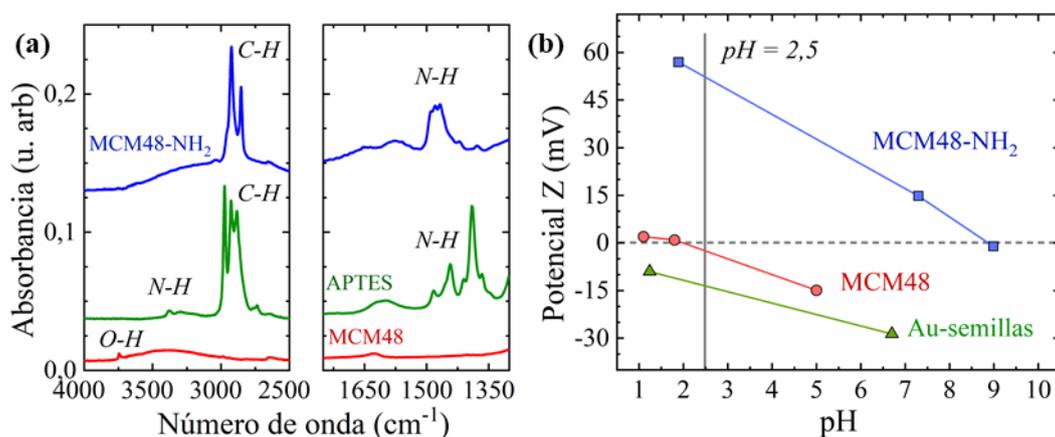


Figura 5.5 (a) Espectro FTIR entre 4000 y 2500 cm^{-1} y 1750 y 1300 cm^{-1} para el APTES puro (verde) y la MCM48 antes (rojo) y después (azul) de funcionalizar con APTES. (b) Potencial Z de las Au-semillas y de la MCM48 antes y después de funcionalizar con APTES.

Las semillas de Au sintetizadas tenían un diámetro de entre $2\text{-}4\text{ nm}$ medido por imágenes de TEM. El anclaje electrostático se realiza en medio ácido, para ello se ajusta el pH a $2,5$ con ácido clorhídrico (HCl). A este pH las Au-semilla siguen manteniendo carga superficial negativa, -12 mV , mientras que las nanopartículas amino-MCM48 tienen carga superficial positiva $+50\text{ mV}$ (Figura 5.5b). También podemos observar que sobre la MCM48 sin aminorar tiene un bajo valor de potencial Z, el valor del punto isoeléctrico se encuentra en torno a 2 , siendo $2,5$ un valor habitual para la sílice.

Se prepararon mezclas amino-MCM48/Au-semillas con diferentes ratios $1:3$, $1:6$ y $1:10\text{ v/v}$ buscando la distribución más homogénea de las Au-semillas sobre la superficie de las amino-MCM48. Todas las mezclas se llevaron a un volumen final de 11 mL completándose con agua destilada en los ratios de $1:3$ y $1:6$. Como puede observarse en

la Figura 5.6a-c, el ratio 1:10 amino-MCM48/Au-semillas muestra la mayor uniformidad y densidad de Au-semillas sobre la superficie de las amino-MCM48.

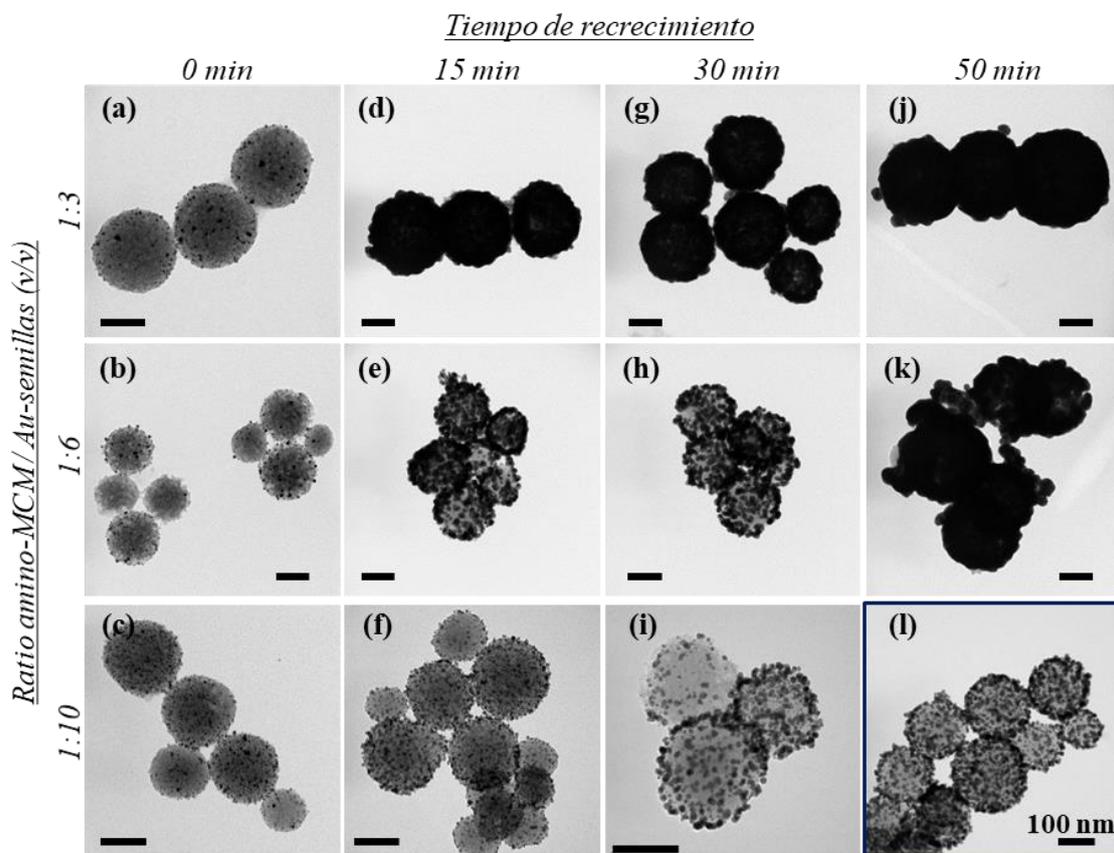


Figura 5.6 Imágenes TEM de las diferentes nanopartículas Au@MCM sintetizadas variando el ratio amino-MCM/Au-semillas (1:3, 1:6 y 1:10) y el tiempo de recrecimiento (0, 15, 20 y 50 min). La condición *l* aparece sombreada por ser la seleccionada. La escala representa 100 nm.

La última etapa de la preparación de las Au@MCM es el recrecimiento de las Au-semillas hasta conseguir AuNP uniformes con un plasmón de absorción suficientemente intenso en el rango del visible. En esta etapa de recrecimiento es crucial mantener un compromiso; por una parte, hemos de evitar recubrir toda la superficie externa de la nanopartícula, que bloquearía la entrada del analito a los poros, y por la otra es necesario tener suficientes nanopartículas de Au recrecidas en la superficie y que se encuentre muy cercanas, para crear una magnificación del campo electromagnético “hot-spots” que aumente la señal Raman. Se utilizó como precursor de Au el $[\text{AuCl}(\text{OH})_3]^-$ por ser menos activo y así poder controlar mejor la velocidad de crecimiento de las semillas. La MCM48-semillada se mezcló con el formaldehído y el precursor de Au bajo condiciones de agitación controladas, 670 rpm, en un baño de hielo. Los tres ratios de amino-MCM48/Au-semillas fueron recrecidas a tres tiempos diferentes: 15, 30 y 50 min. La

Figura 5.6 muestra imágenes TEM de todas las condiciones de síntesis estudiadas. Como se puede observar, la misma cantidad de precursor de oro produce diferentes nanopartículas de Au@MCM dependiendo del ratio amino-MCM48/Au-semillas inicial. En el caso del ratio 1:3, primera fila Figura 5.6, las Au-semillas crecen tanto que desde el minuto 15 ya se ha creado una *shell* densa de oro sobre las MCM48 perdiéndose la capacidad de adsorción de esta. Por otro lado, los tiempos de recrecimiento de 15 y 30 min para el ratio 1:6 generan AuNP individuales en la superficie de la MCM48 pero su excesivo tamaño puede bloquear ligeramente los mesoporos (Figura 5.6e-h). Estas AuNP siguen creciendo hasta formar una *shell* compacta de oro para el tiempo de recrecimiento de 50 min (Figura 5.6k). Finalmente, Au@MCM homogéneas con AuNP con un diámetro promedio de 15 ± 3 nm fueron preparadas para un tiempo de recrecimiento de 50 min del ratio amino-MCM48/Au-semillas 1:10 (Figura 5.6l). Estas diferencias entre ratios y tiempos podrían explicarse considerando los mecanismos de nucleación y crecimiento. Cuando las partículas de MCM48 tiene pocas Au-semillas (1:3), cada Au-semilla puede crecer más con la misma cantidad de precursor de oro creándose una *shell* densa de oro sobre las MCM48. Por el contrario, cuando la MCM48 tiene un gran número de Au-semillas en su superficie, cada Au-semilla crece menos manteniendo su forma e individualidad y en algunos casos quedando muy cercana a otras semillas. Al mismo tiempo, no se cubre toda la superficie al completo dejando libre el acceso a los poros para aprovechar la capacidad de adsorción de la partícula MCM48 *core*.

Los espectros UV-Vis de absorción de los diferentes ratios y tiempos de recrecimiento nos aportan información sobre la morfología del oro recrecido, es decir, si tenemos *shell* de Au o AuNP individuales. El espectro de los ratios 1:3 y 1:6 desde el tiempo de recrecimiento de 15 min coincide con tener una *shell* compacta de oro sobre la partícula de MCM48 (Figura 5.7a-b) [371]. En el caso del ratio 1:6 y tiempos 15 y 30 min se corrobora que las AuNP son tan grandes que están casi formando una *shell* sobre la superficie bloqueando a su vez las propiedades de adsorción de la MCM48. Finalmente, el ratio 1:10 (Figura 5.7c) muestra AuNP individuales donde el plasmón de absorción se va desplazando hacia mayores longitudes de onda conforme aumenta su tamaño, el máximo de absorción se presenta a 566 nm para las Au@MCM crecidas durante 50 min

Por esta razón, se estableció el tiempo de recrecimiento de 50 min del ratio 1:10 como las condiciones óptimas para conseguir Au@MCM con buenas propiedades

plasmónicas y de absorción, en adelante las nanopartículas denominadas Au@MCM se habrán preparado en estas condiciones.

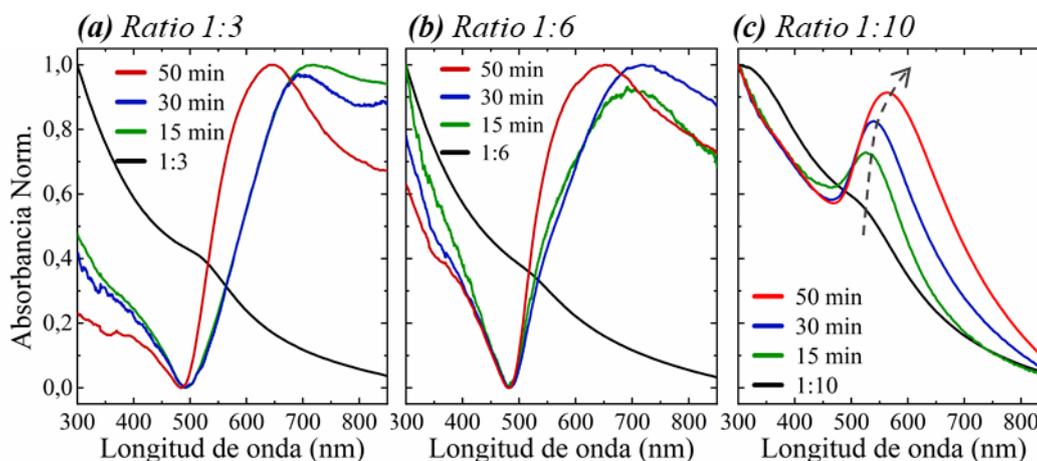


Figura 5.7 Espectro UV-Vis normalizado para los ratios amino-MCM/Au-semillas (a) 1:3, (b) 1:6 y (c) 1:10 y los tiempos de recrecimiento de 15, 30 y 50 min. La flecha en (c) indica como se desplazaba el máximo de absorción con el tiempo de recrecimiento de las AuNP.

Para verificar que el tiempo de recrecimiento óptimo eran 50 min, se realizaron simulaciones FDTD de la serie 1:10 a la longitud de onda de excitación de 785 nm. Para ello se consideró la partícula de MCM48 como una superficie plana de la misma área que la partícula esférica 25466 nm^2 , es decir, se simuló un área cuadrada de $159 \text{ nm} \times 159 \text{ nm}$. Las AuNP se consideraron esferas 3D colocadas sobre la superficie de MCM. Las imágenes de TEM determinaron que el diámetro promedio en cada una de las condiciones era 4, 7, 10 y 15 nm para 0, 15, 30 y 50 min, respectivamente. La distancia de centro-a-centro de dos AuNP vecinas fue 20 nm para todas las condiciones simuladas, resultando en un espaciado entre AuNP de 16, 13, 10 y 5 nm para los tiempos de recrecimiento de 0, 15, 30 y 50 min, respectivamente. El resultado de estas simulaciones FDTD aparece en la Figura 5.8 donde la escala de color representa la amplitud del campo eléctrico normalizado $|E|^2$ respecto a la amplitud del campo eléctrico de la fuente de excitación $|E_0|^2$ que se considera 1. Podemos observar que al reducir el espaciado entre las AuNP el campo eléctrico aumenta. El campo eléctrico máximo se alcanza cuando el espaciado entre AuNP es de alrededor de 5 nm, correspondiente al tiempo de crecimiento de 50 min. De este modo se seleccionaron como condiciones óptimas el ratio 1:10 recrecido durante 50 min, y las nanopartículas preparadas por este método se denominarán en adelante Au@MCM.

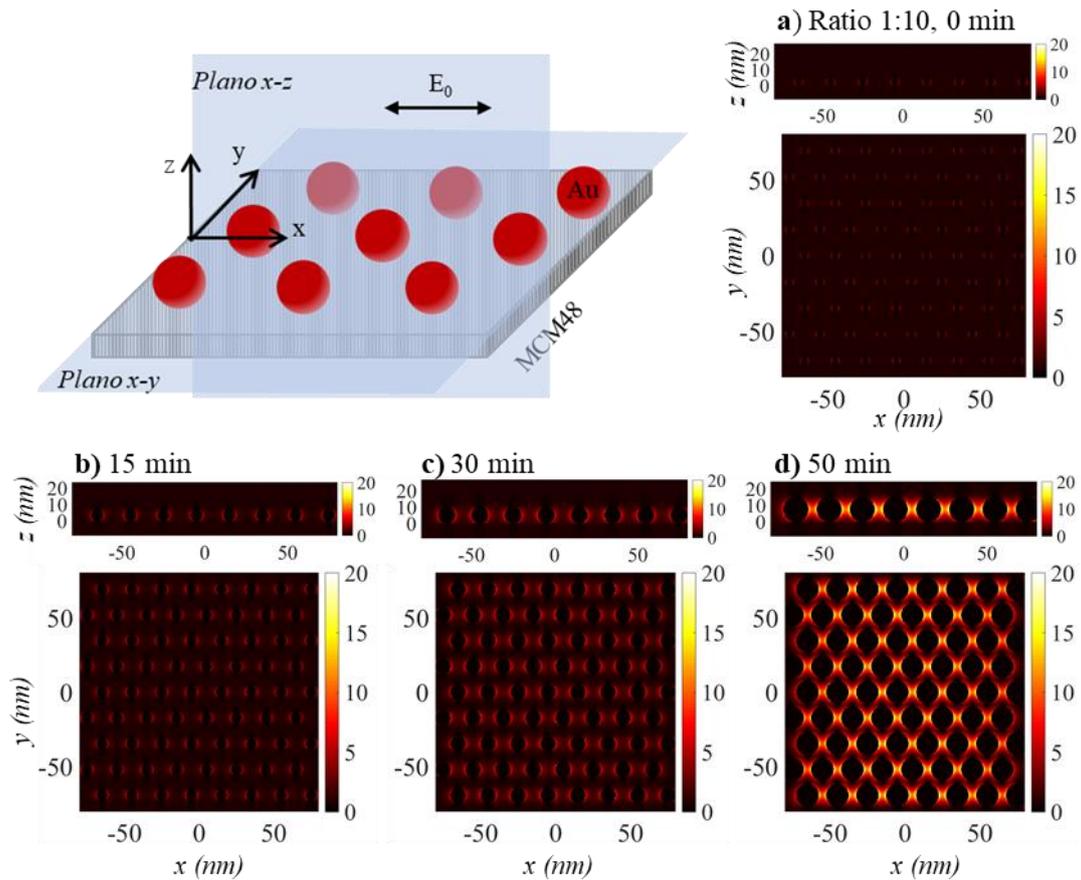


Figura 5.8 Simulación FDTD de la distribución de la amplificación del campo eléctrico a la longitud de onda de excitación de 785 nm para el ratio amino-MCM48/Au-semillas 1:10 y los tiempos de recrecimiento de (a) 0 min, (b) 15 min, (c) 30 min y (d) 50 min. Los planos atraviesan a las AuNP por su ecuador.

Para confirmar que las AuNP se encuentran en la superficie de la MCM48 y que no se bloquea la entrada de todos los poros, se realizó una tomografía 3D de la Au@MCM. Agradecemos al Dr. Raúl Arenal el tiempo invertido en la reconstrucción 3D de la partícula mediante tomografía con el equipo STEM FEI Titan (ver Anexo I). En la Figura 5.9a podemos observar las imágenes de la nanopartícula Au@MCM tomadas desde diferentes ángulos, corroborando que las AuNP se encuentran homogéneamente distribuidas por toda la superficie de la MCM48 y que no toda la superficie está cubierta. Asimismo, se realizaron cortes a diferentes profundidades de la Au@MCM y en todos ellos observamos que las AuNP se encuentran en la superficie de la MCM48. Aparentemente no hay internalización las semillas de 2-4 nm en los poros de 3,5 nm de la MCM-48 (Figura 5.9b). La Figura 5.9c muestra estos mismos cortes con una escala de color donde resaltan las AuNP y puede observarse mejor la proximidad, que hace posible la generación de puntos calientes, y el tamaño de las AuNP.

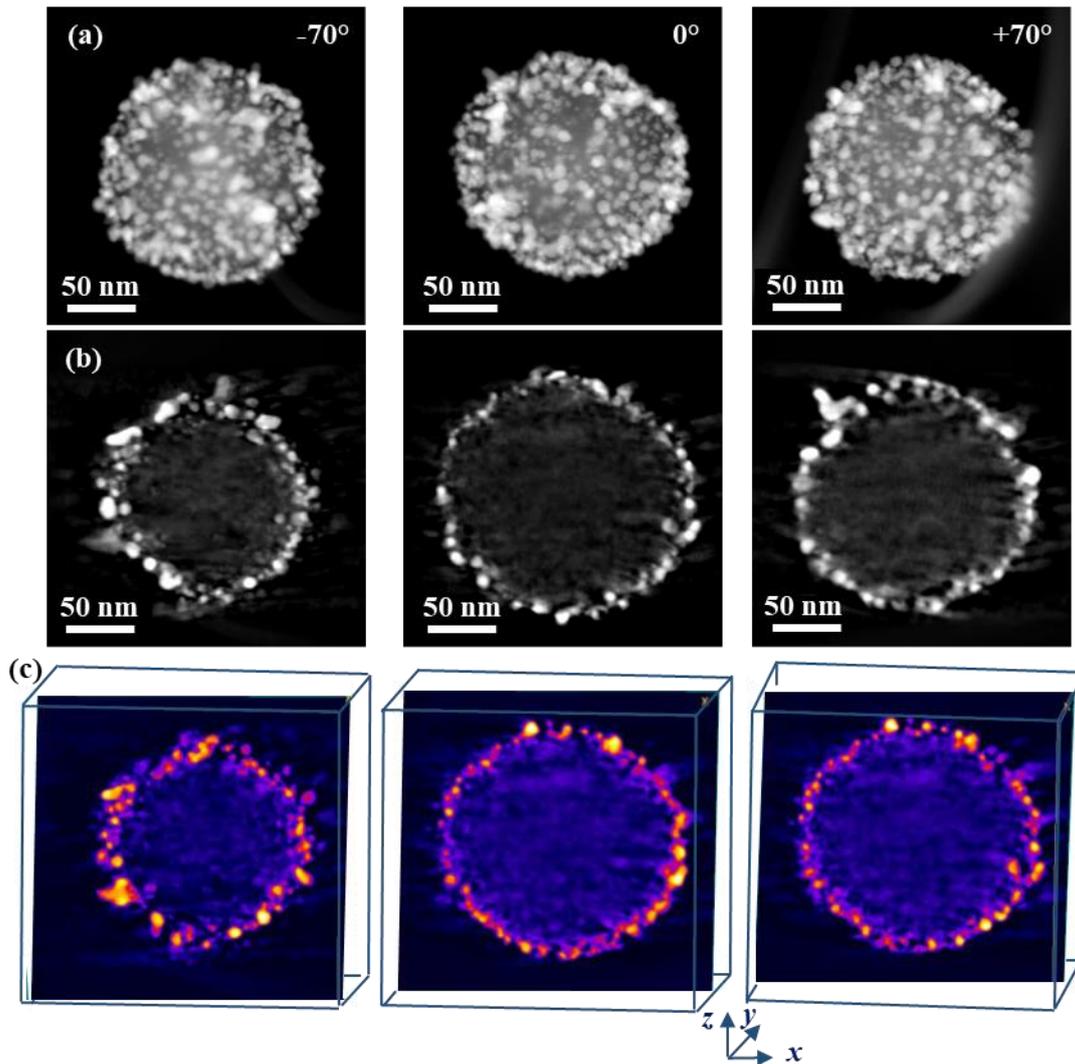


Figura 5.9 Tomografía de una partícula Au@MCM: (a) proyecciones a diferentes ángulos; (b) secciones/cortes XY a diferentes profundidades del volumen reconstruido; (c) cortes XY en escala de color resaltando el oro de la superficie.

Las imágenes de TEM (Figura 5.10) de diferentes lotes muestran la alta reproducibilidad del protocolo de síntesis. Podemos observar que en todos los casos la distribución y densidad de AuNP sobre la MCM48 es similar. Este parámetro viene fijado de la etapa de anclaje de las semillas a la MCM48. Por otro lado, la reproducibilidad de la etapa de recrecimiento se observa en la distribución de tamaños de las AuNP.

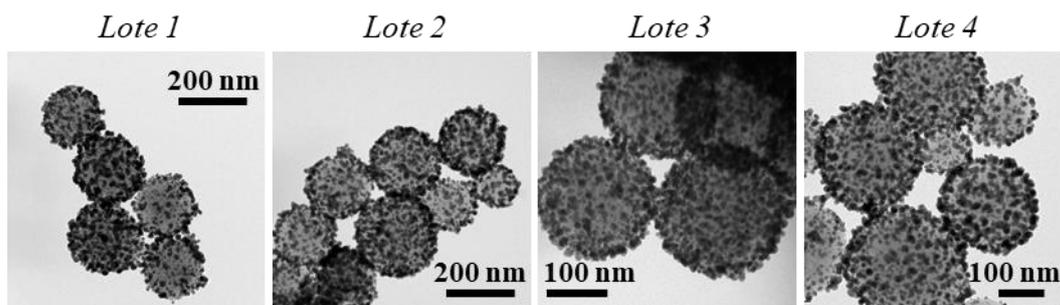


Figura 5.10 Reproducibilidad del protocolo de síntesis. Imágenes TEM de cuatro lotes de fabricación de Au@MCM.

Se intentó simplificar el protocolo anclando directamente AuNP de mayor tamaño a la MCM48. Se realizaron ensayos con las AuNP@citrato, 22 nm de diámetro, pero este mayor tamaño hacía que durante el centrifugado para retirar el exceso de nanopartículas no ancladas la mayoría de las ancladas se soltaran. El resultado fueron MCM48 con una baja densidad de AuNP@citrato sobre la superficie y muy heterogéneas (Figura 5.11a).

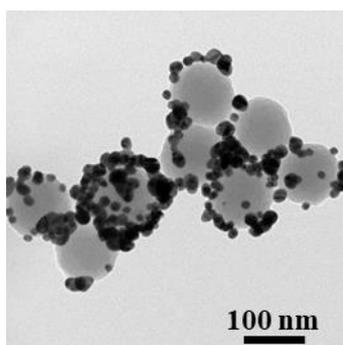


Figura 5.11 Imagen TEM de MCM48 recubierta con AuNP@citrato de 22 nm de diámetro

Para comparar los resultados se utilizaron como referencia nanopartículas de sílice densa sintetizada siguiendo el protocolo de Stöber. Las Au@Stöber se prepararon siguiendo el mismo protocolo que para el Au@MCM. La Figura 5.12a-b muestra imágenes TEM de las nanopartículas de sílice Stöber y de las Au@Stöber donde podemos observar que la reproducibilidad de la síntesis es extrapolable a otras partículas *core* de tamaño similar. Las nanopartículas de sílice densa presentan un tamaño de 177 ± 20 nm y las AuNP de la superficie 12 ± 4 nm. Esto se traduce en un máximo del LSPR desplazado a menores longitudes de onda, 528 nm (Figura 5.12c), respecto al de Au@MCM 564 nm.

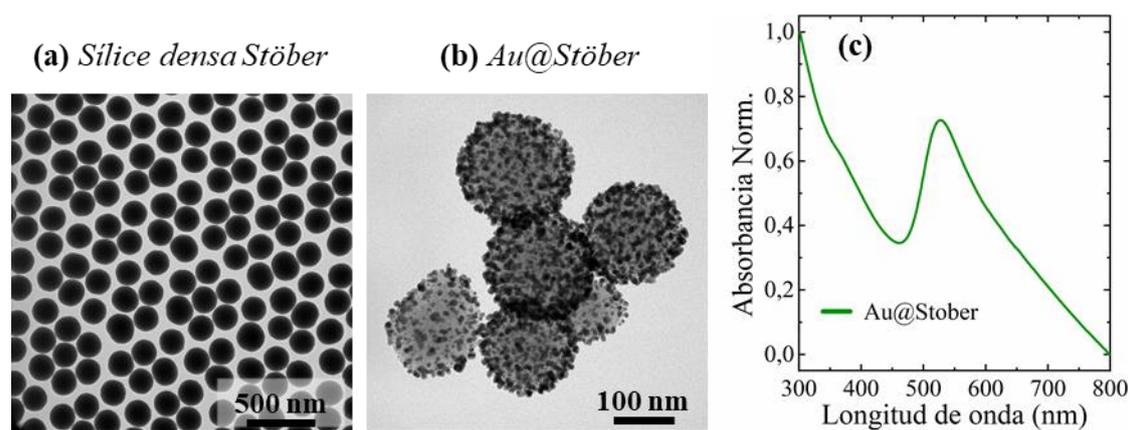


Figura 5.12 Imágenes TEM de (a) nanopartículas de sílice densa de Stöber; (b) nanopartículas Au@Stöber. (c) Espectro UV-Vis normalizado de Au@Stöber.

5.2.2.2 Caracterización de los sustratos SERS

Las nanopartículas Au@MCM se depositaron en la bañera del chip de silicio mediante *spin coating*. Los parámetros que se optimizaron fueron la concentración de la suspensión de nanopartículas, el volumen a dispersar y la velocidad y tiempo de espineado (Anexo IV-b.ii, pág. 266). El protocolo de espineado seleccionado permitió cubrir la bañera de nanopartículas Au@MCM (Figura 5.13a). Podemos observar que las Au@MCM se encuentran formando multicapas compactas en las que el interespaciado entre nanopartículas es mínimo. Estos recubrimientos son claramente mayores a los realizados hasta el momento donde siempre se formaba una única capa de nanopartículas sobre la superficie.

El espectro de absorción UV-Vis se midió sobre un sustrato de pyrex en el que se han espineado las Au@MCM y Au@Stöber, siguiendo el mismo protocolo que sobre el chip de microfluídica. En ambos casos, los espectros muestra una banda ancha de absorción entre 600 y 900 nm que puede explicarse por el acoplamiento entre los momentos dipolares de partículas próximas [335].

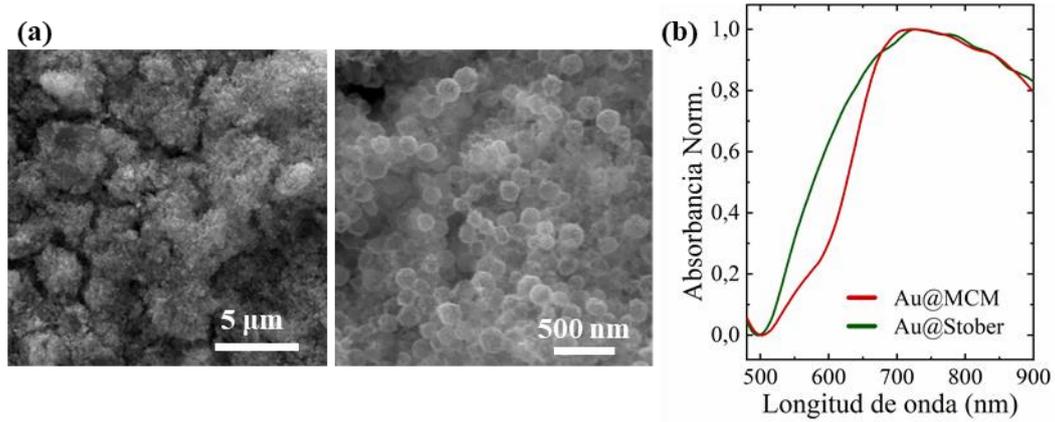


Figura 5.13 Imágenes SEM de los recubrimientos de Au@MCM en la bañera del chip de microfluídica. (b) Espectros de absorción UV-Vis promedio ($N = 5$) de los sustratos SERS Au@MCM y Au@Stöber.

El cálculo del AEF y los experimentos a bajas concentraciones de DMMP, así como, los experimentos con Au@Stöber, se realizaron utilizando sustratos SERS planos preparados sobre soportes de SiO_2/Si de $4 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$. Sobre estos soportes se depositaron las nanopartículas siguiendo el mismo protocolo de espineado que sobre el chip de microfluídica.

5.2.2.3 Caracterización de las propiedades de adsorción

En primer lugar, se realizó un estudio para estimar la capacidad de adsorción estática de las partículas de sílice mesoporosa MCM48 y sílice densa de Stöber. La capacidad es la cantidad de adsorbato que el adsorbente es capaz de retener por unidad de masa del adsorbente. El análisis termogravimétrico después de la adsorción con DMMP muestran pérdida de masa que viene dada por el área bajo la curva (Figura 5.14), los resultados aparecen en la Tabla 5.1. En el caso de la MCM48 podríamos considerar que el pico centrado a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ se corresponde con la pérdida de agua superficial. El pico centrado a $96 \text{ }^\circ\text{C}$ podría corresponderse al DMMP adsorbido cerca de la superficie y el pico ancho centrado a $170 \text{ }^\circ\text{C}$ con el DMMP adsorbido dentro de los mesoporos. Teniendo en cuenta estos datos se estimó que la capacidad de adsorción de DMMP en la MCM48 es de 317 mg/g . En el caso de la sílice densa, solo hay adsorción del DMMP en la superficie y este debe competir con la humedad ambiental la mezcla de ambos resulta en una capacidad de adsorción de 16 mg/g . Los experimentos se realizaron secando previamente las muestras en la estufa durante 24 h a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ para minimizar la adsorción de agua. Estos resultados nos muestran que la MCM48 tiene una capacidad de adsorción de DMMP 20 veces superior a la sílice densa de Stöber.

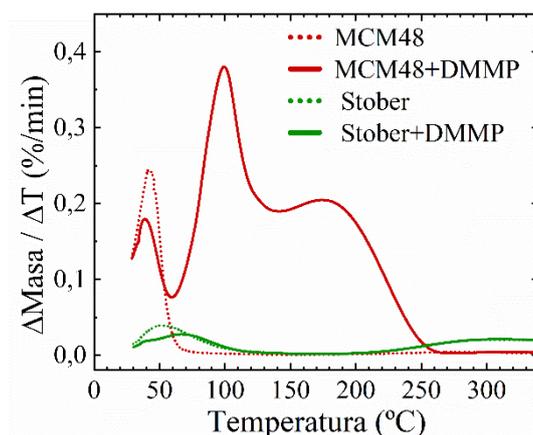


Figura 5.14 Análisis termogravimétrico de las nanopartículas de sílice mesoporosa MCM48 y densa Stöber expuestas a una atmósfera saturada de DMMP (739 ppmV).

Tabla 5.1 Capacidad de adsorción de la sílice mesoporosa MCM48 y la densa de Stöber expuestas a una atmósfera saturada de DMMP (747 ppmV).

	MCM48 (mg/g _{MCM48})			Stöber (mg/g _{Stöber})
	$\Delta m < 60\text{ }^{\circ}\text{C}$	$60\text{ }^{\circ}\text{C} < \Delta m < 120\text{ }^{\circ}\text{C}$	$120\text{ }^{\circ}\text{C} < \Delta m$	$\Delta m < 150\text{ }^{\circ}\text{C}$
DMMP (747 ppmV)	38	120	197	16

En segundo lugar, se evaluaron las capacidades de adsorción dinámica de los chips de MCM-semillada-1:10 y Au@MCM representando sus curvas de ruptura (Figura 5.15a). La forma de la curva depende de las velocidades de adsorción y del fluido, la naturaleza del equilibrio de adsorción, las concentraciones de adsorbato en la alimentación y en el sólido y de la longitud del lecho. En la Figura 5.15a podemos observar que ambas curvas se superponen indicando que la cinética del proceso es la misma y que por tanto las AuNP individuales sobre la superficie de la MCM48 dejan libre la entrada a los poros del material poroso y el analito puede difundir libremente, corroborando lo observado en los cortes transversales del TEM (Figura 5.9c, pág. 140).

La regeneración se realizó calentado a 200 °C durante 60 min pasando una corriente seca de N₂ 10 mL/min. Se realizaron cinco ciclos adsorción/desorción de DMMP en el chip Au@MCM (Figura 5.15b). Podemos observar que el material se comporta de idéntica manera en los cinco ciclos. Una vez que se aplica la temperatura se produce una desorción rápida de prácticamente todo el DMMP y después una desorción más lenta y continuada hasta la completa desorción que se produce entorno a los 37 min.

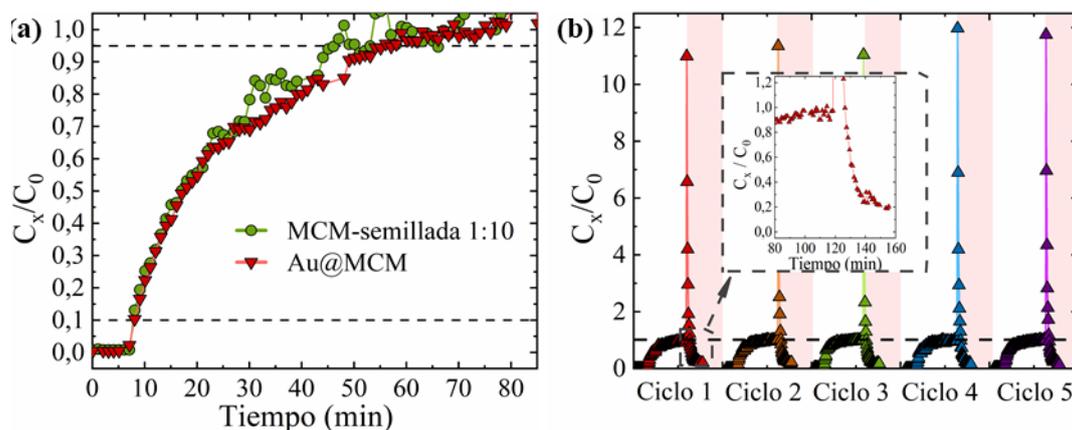


Figura 5.15 (a) Curvas de ruptura de la adsorción de DMMP (3 ppmV) en el microchip de MCM-semillada-1:10 y en el de Au@MCM. La línea punteada inferior corta el tiempo de ruptura y la superior el tiempo de saturación. (b) Cinco ciclos de adsorción/desorción de DMMP 3 ppmV en un mismo dispositivo Au@MCM. El área sombreada representa la desorción aplicando una diferencia de potencial *in-situ*, 200 °C. Inserto: tiempo de desorción del ciclo 1.

La preparación de los sustratos SERS en estos chips compactos de microfluídica nos va a permitir tener una aproximación más cercana a la aplicación final de estos sensores SERS, ya que nos permite detectar y regenerar *in-situ*.

5.2.2.4 Cálculo del AEF con R6G

El AEF se calculó para los sustratos MCM, MCM_semillada-1:10, Au@MCM y Au@Stöber a través de la Ecuación 2.4 (pág. 50) donde I_{SERS} fue el promedio de 20 medidas realizadas en diferentes puntos de cada uno de los sustratos. No se pudieron realizar *mappings* por la alta rugosidad del recubrimiento, ver imágenes SEM de la Figura 5.13a.

El promedio de la intensidad del pico a 1510 cm^{-1} en cada uno de los sustratos medidos aparece en la Figura 5.16. La mayor amplificación de la señal se obtuvo sobre Au@MCM, 4556 ± 780 cts, y una RSD del 17% frente al 23% de la señal de la Au@Stöber, 1029 ± 240 cts. Para asegurarnos que esta amplificación tenía su origen en las propiedades plasmónicas de las partículas y no en las propiedades de adsorción de la sílice mesoporosa se midieron los sustratos MCM48 y amino-MCM48. En ninguno de los dos casos se obtuvo señal, reforzando la necesidad de tener la combinación de partículas con propiedades plasmónicas y de adsorción. Los valores de AEF fueron $1,2 \times 10^7$ para Au@MCM y $2,5 \times 10^6$ para Au@Stöber demostrando las buenas propiedades plasmónicas de ambas nanopartículas. El ratio $AEF_{Au@MCM}/AEF_{Au@Stöber}$ fue

4,7, esta mejora del aumento con la sílice porosa demuestra el efecto de concentración del adsorbato en la fase sólida, cerca de las nanopartículas plasmónicas. Estas plataformas SERS, compuestas de materiales porosos y nanopartículas plasmónicas, son especialmente relevantes en el caso de detección de compuestos en fase gas, donde el número de moléculas por unidad de volumen es varios ordenes de magnitud menor que en el caso de líquidos.

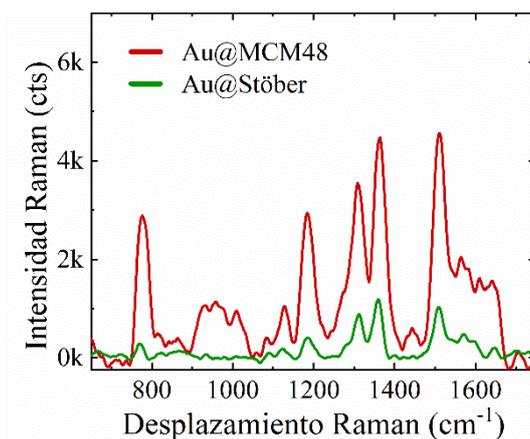


Figura 5.16 Espectro SERS de la R6G (1 μM) recogido sobre los sustratos Au@MCM y Au@Stöber.

5.2.2.5 Detección de DMMP en fase gas

Las capacidades de detección del sustrato SERS Au@MCM se estudiaron usando como analito diana vapores de DMMP con una concentración de 2,5 ppmV. En cada sustrato y condiciones experimentales se hicieron 20 medidas. En la Figura 5.17a podemos observar el espectro promedio del DMMP recogido sobre el sustrato Au@MCM junto con el espectro de referencia del DMMP y el espectro recogido sobre Au@MCM antes de alimentar los vapores. Hasta 6 modos vibracionales del DMMP son claramente distinguibles, las etiquetas *c-j* se corresponden con la nomenclatura de la Tabla 2.5, pág. 55. El modo principal del DMMP correspondiente al enlace P-C aparece a 708 cm^{-1} (banda *c* de la Figura 5.17a), el doble pico correspondiente al enlace PO_2 aparece a 794 y 835 cm^{-1} (bandas *d* y *e*), y los picos correspondientes al enlace C-O aparecen a 1067 y 1107 cm^{-1} (bandas *g* y *h*) y la vibración del enlace P=O aparece a 1270 cm^{-1} (banda *j*). Este último pico ha sufrido el mayor cambio de intensidad indicándonos que posiblemente la interacción con el grupo amino haya sido por este grupo. Acompañando a los picos del DMMP aparece a 427 cm^{-1} el pico correspondiente a la sílice (indicado con una *).

Por el contrario, el sustrato Au@Stöber solo fue capaz de detectar un pico del DMMP, el principal, el modo vibracional del enlace P-C, y el pico correspondiente a la sílice. Otra diferencia significativa es la diferencia de intensidad entre el espectro recogido sobre Au@MCM y Au@Stöber siendo 11 veces más intenso sobre Au@MCM. Estos resultados demuestran las excelentes propiedades plasmónicas y de adsorción de las nanopartículas Au@MCM capaces de adsorber una mayor cantidad de DMMP cerca de la superficie metálica donde se produce la mayor amplificación de la señal por efecto SERS.

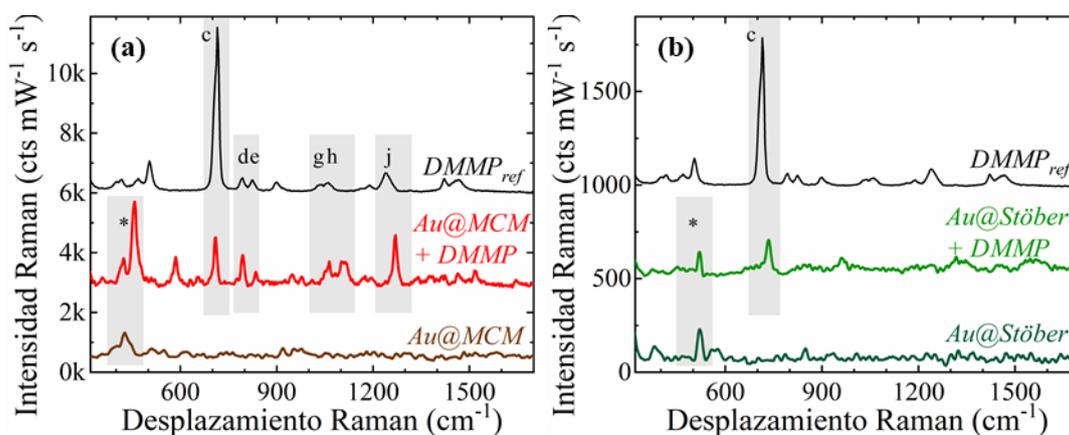


Figura 5.17 (a) Espectro SERS promedio del DMMP (2,5 ppmV) recogido sobre el sustrato Au@MCM comparado con el espectro Raman del DMMP puro y el control del sustrato Au@MCM. (b) Espectro SERS promedio del DMMP (2,5 ppmV) recogido sobre el sustrato Au@Stöber. Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor comparación. Para más información sobre la asignación de picos ver Tabla 2.5 (pág. 55).

Además, se estudió la capacidad del sustrato Au@MCM para detectar concentraciones inferiores a las partes-por-millón. Para ello se prepararon bolsas de gases de 900, 250, 100 y 50 ppbV, cada una de ellas fue medida en un sustrato diferente de Au@MCM. La Figura 5.18a compara los espectros promedio obtenidos para las concentraciones de DMMP estudiadas siendo posible en todos los casos la detección. Al disminuir la concentración de DMMP algunos de los seis modos vibracionales del DMMP se desplazaron o desaparecieron, sin embargo, el modo vibracional del PC a 708 cm^{-1} fue claramente distinguible en todas las concentraciones alimentadas. Como se ha comentado previamente en el caso las AuNP@citrato, el desplazamiento de las bandas Raman de una molécula puede producirse a bajas concentraciones debido al grado de recubrimiento sobre la superficie [218,393].

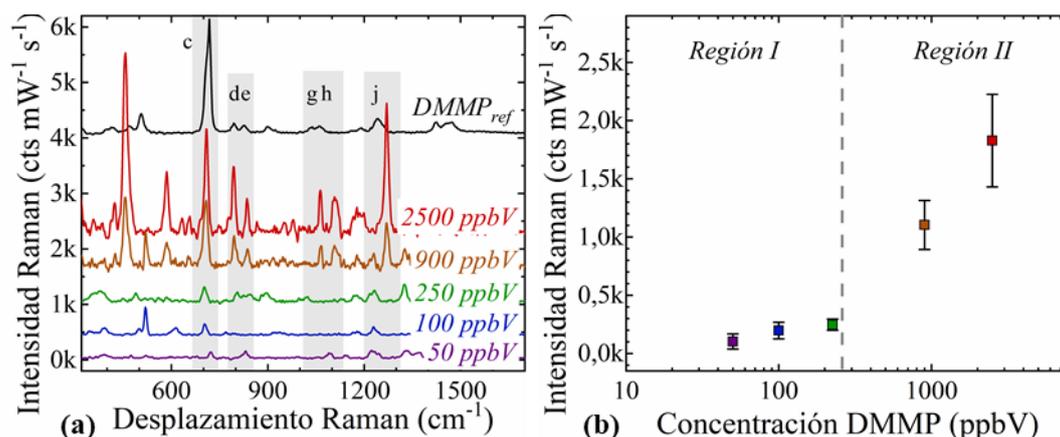


Figura 5.18 (a) Espectro SERS de diferentes concentraciones de DMMP (2500 – 50 ppbV) recogidas sobre Au@MCM, junto con el espectro Raman del DMMP puro. Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados. Para más información sobre la asignación de picos ver Tabla 2.5 (pág. 55). (b) Intensidad SERS del pico desplazado a 708 cm⁻¹ (banda *c* en (a)) en función de la concentración de DMMP. Las barras de error representan la desviación estándar de 20 espectros.

En Figura 5.18b aparece el promedio de la intensidad del pico a 708 cm⁻¹ en función de la concentración de DMMP. En la gráfica podemos observar dos regiones, la región *II* coincidiría con la zona de cuantificación, al tener únicamente dos/tres puntos no hemos calculado la recta de regresión. En la región *I* el número de moléculas presentes en la fase gas impediría llenar los poros y la señal SERS solo se detectaría en algunos puntos de la muestra. La RSD de la señal se mantiene por debajo del 20% hasta la concentración de 100 ppbV, y por debajo de ésta, aumenta hasta ser superior al 60%, ya que solo se detecta DMMP en algunos puntos de la muestra. Esta relación entre la señal y bajas concentraciones de analito ha sido reportado previamente en la detección de pireno, nitropireno y antraceno en fase gas usando nanopartículas de oro recubiertas de moléculas orgánicas [394]. El límite de detección teórico de 50 ppbV es 12 veces inferior a lo alcanzado experimentalmente por las AuNP@citrato, 625 ppbV, mejor resultado hasta el momento.

La Figura 5.19 muestra en columnas la intensidad el pico del DMMP a 708 cm⁻¹ y de la MCM48 a 456 cm⁻¹ en los 20 espectros recogidos sobre Au@MCM a una concentración de DMMP de 2,5 ppmV. En general, al aumentar la intensidad del pico de la MCM48 aumenta de manera proporcional la intensidad del pico de DMMP. Por esta razón, se decidió normalizar los resultados con el pico de la MCM48. En la Figura 5.19 los puntos azules representan el ratio entre la intensidad del pico del DMMP y el de la

MCM48 desplazados a 708 cm^{-1} y 456 cm^{-1} , respectivamente. El ratio promedio fue de 0,58 con una RSD del 15%.

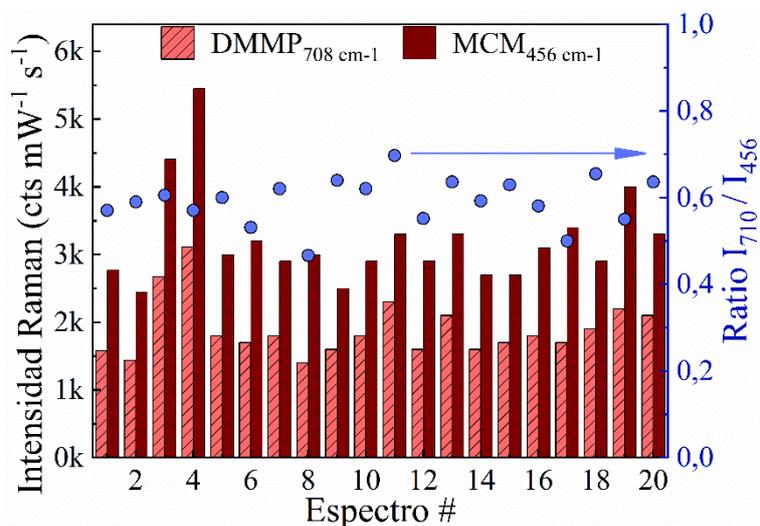


Figura 5.19 Eje izquierdo, columnas: intensidad SERS del pico desplazado a 708 cm^{-1} del DMMP y a 456 cm^{-1} correspondiente a la MCM en los 20 espectros recogidos sobre Au@MCM y la concentración de $2,5\text{ ppmV}$. Eje derecho, puntos azules: ratio entre el pico de DMMP y MCM, 710 cm^{-1} y 456 cm^{-1} , respectivamente.

En la aplicación final los sustratos se medirán con equipos portables, por esta razón, se caracterizó la reproducibilidad de la detección, el tiempo de respuesta y la regeneración del chip con Au@MCM con el equipo portable BWTEK. La reproducibilidad de la medida y del sustrato se evaluó realizando medidas a lo largo del sustrato SERS. En la Figura 5.20a podemos observar que el ratio entre picos se mantiene constante a lo largo del todo el sustrato. Estos resultados son la demostración de la identificación de DMMP en fase gas utilizando un equipo portable y un chip de detección compacto similares a los que se utilizaran en las condiciones reales de campo.

También estudiamos el tiempo de respuesta del Au@MCM como sensor SERS. La Figura 5.20b nos muestra los espectros recogidos sobre Au@MCM durante los primeros cuatro minutos de exposición a los $2,5\text{ ppmV}$ de DMMP. En todos los espectros podemos observar las cuatro bandas características del DMMP correspondientes al enlace PC (centrada a 718 cm^{-1} , banda *c* en Figura 5.20b), enlace PO_2 (centrada a 802 cm^{-1} y mezcla de las bandas *d* y *e*) y el doble pico de la vibración del enlace C-O centrados a 1023 cm^{-1} y 1113 cm^{-1} , bandas *g* y *h*, respectivamente. Sin embargo, las bandas son más anchas que las recogidas con el equipo de sobremesa (Figura 5.17a) debido a la menor resolución espectral del equipo portable. De estos espectros y los datos de la Figura 5.21a calculamos

el $t_{50\%}$ y $t_{90\%}$ que se definen con el tiempo que cuesta alcanzar el 50% y el 90% de la intensidad final. El $t_{50\%}$ fue 120 s y $t_{90\%} = 180$ s. Este valor de tiempo de respuesta es inferior al obtenido con los AgPlates@grafito, 137 s, también medidos con el equipo portable.

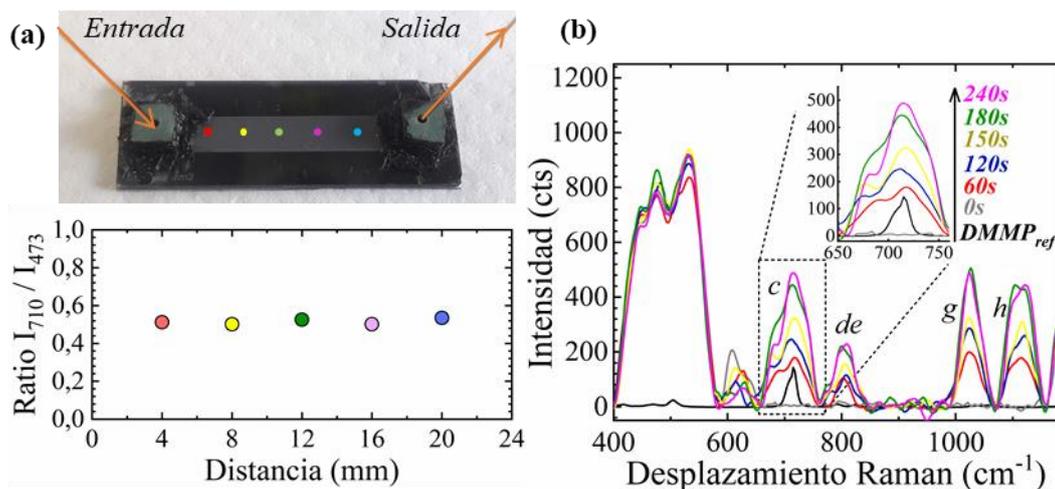


Figura 5.20 Detección de 2,5 ppmV de DMMP utilizando los chips de Au@MCM y el equipo Raman portable. **(a)** Imagen óptica del chip de Au@MCM y gráfica del ratio DMMP/MCM48 medido en el chip en función de la distancia. **(b)** Espectros SERS del DMMP medidos en el punto rojo de (a) durante la adsorción de DMMP a los tiempos indicados.

Para estudiar la curva de ruptura desde el punto de vista de la concentración en fase gas, en el lecho de adsorbente (Figura 5.20), se realizaron experimentos de adsorción/desorción de DMMP monitorizando la señal cerca de la entrada y de la salida del chip, punto rojo y azul de la Figura 5.20a, respectivamente. Cada ciclo de adsorción consistió en 50 min pasando DMMP recogiendo la señal cada 60 s, y a continuación, barrer el DMMP no adsorbido pasando durante 5 min una corriente seca de N_2 , 10 mL/min. La desorción se realizó calentando el chip *in-situ*, conectando las pistas de oro a una fuente de voltaje. Un voltaje de 15 V, 0,56 A, calienta el chip hasta los ~ 200 °C. Durante la desorción se barrió el chip con una corriente de N_2 de 10 mL/min y se recogió la señal cada 30 s durante los primeros cuatro minutos, cada 60 s hasta el minuto 30 y luego se fueron distanciando las medidas hasta llegar a las 12 h.

La Figura 5.21 recoge el ratio promedio de las intensidades DMMP/MCM48 durante los tres experimentos a la entrada y los tres a la salida. Cuando medimos a la entrada del chip Au@MCM en menos de 4 minutos se alcanza el ratio máximo y a partir de ahí se mantienen constante (Figura 5.21a). Esto demuestra el avance del frente de adsorción a

lo largo del chip. Las partículas de la entrada se llenan rápidamente y una vez se han saturado, la señal deja de aumentar. A la salida observamos como el frente de adsorción llega más tarde (Figura 5.21b). En los primeros minutos se produce un pequeño aumento de la señal, ratio $\sim 0,10$, pero no es hasta el minuto 14 cuando se produce un aumento drástico del ratio por el aumento de la intensidad del pico de DMMP, es decir, se ha producido la detección de este. El DMMP entra al chip y va llenando los poros de las nanopartículas de Au@MCM que va encontrando, de ahí, que las Au@MCM que se encuentran cerca de la salida sean las últimas en llenarse desfasando la detección hasta el minuto 15. Estas curvas siguen la misma tendencia que las curvas de ruptura medidas con el chip acoplado al cromatógrafo de gases (Figura 5.15a). Las curvas de medida alcanzaron la saturación a los 30 min, pero en este caso se miden a la salida, y en Raman el último punto de medida fue a 5 mm de la salida. Una vez que se ha alcanzado la meseta, la RSD a la entrada y a la salida fue de un 9%. Estos resultados nos demuestran la alta homogeneidad de la señal y del chip de microfluídica Au@MCM.

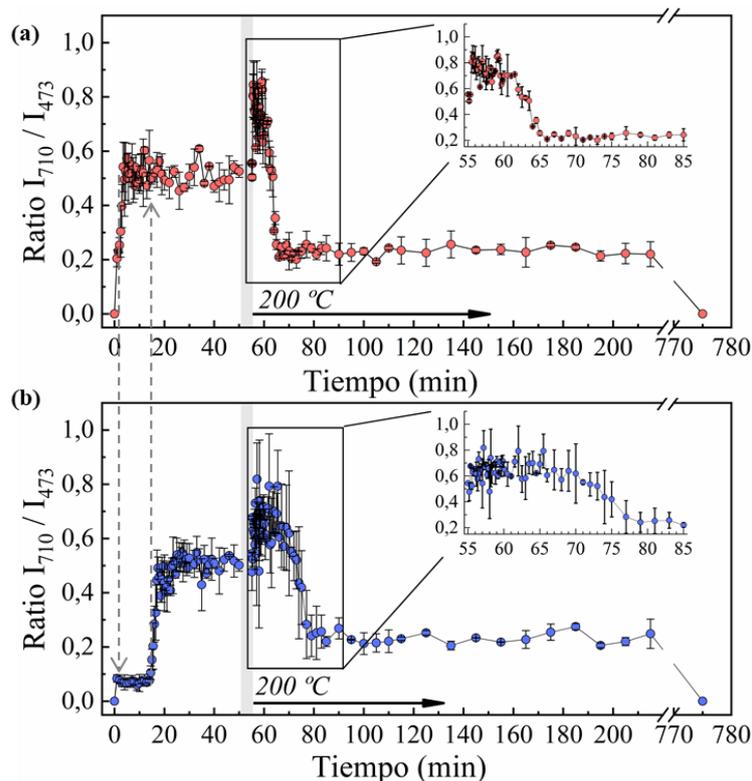


Figura 5.21 Adsorción y desorción de 2,5 ppmV de DMMP utilizando los chips de Au@MCM y el equipo Raman portable. Ratio promedio de la intensidad DMMP/MCM48 medido (a) a la entrada y (b) a la salida del chip, puntos rojo y azul en Figura 5.20a, respectivamente. Insertos: magnificación del tiempo de desorción. La zona sombreada indica el barrido con N_2 antes de comenzar la desorción a 200°C. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos.

Todos estos resultados muestran la robustez de la plataforma Au@MCM como sensor SERS combinando las propiedades plasmónicas de las AuNP con las propiedades adsorbentes de la MCM48. Su integración en un chip de microfluídica compacto junto con sus capacidades de detección utilizando equipos portables lo convierten en un potencial sensor SERS de agentes neurotóxicos en fase gas.

5.3 NANOPARTÍCULAS *CORE-SHELL* Au@Ag@ZIF8 PARA LA DETECCIÓN DE GASES NEUROTÓXICOS Y LACRIMÓGENOS EN FASE GAS⁹

5.3.1 Procedimiento experimental

5.3.1.1 Materiales

Ácido cloroaúrico (HAuCl₄, 99,9%), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 98%), cloruro de hexadeciltrimetilamonio (CTAC, 25% en peso), nitrato de plata (AgNO₃), hidroquinona, borohidruro de sodio (NaBH₄, 99%), ácido L-(+)-ascórbico, 2-metilimidazol (2-MeIm, 99%), nitrato de zinc hexahidratado (Zn(NO₃)₂·6H₂O, 99%), metilfosfonato de dimetilo (DMMP, 97%) y el metanol se compraron en Sigma Aldrich y se usaron como se recibieron. Las obleas de silicio con 1 μm de óxido de silicio térmicamente depositado (SiO₂/Si) se adquirieron en SilTronix.

5.3.1.2 Síntesis de las nanopartículas Au@Ag@ZIF8

La síntesis de los *rods* de Au@Ag recubiertos de ZIF8, en adelante Au@Ag@ZIF8, fue realizada y optimizada por el grupo de la Dr. Isabel Pastoriza y el Dr. Jorge Pérez-Juste en el Departamento de Química Física de la Universidad de Vigo.

La síntesis de los Au@Ag@ZIF8 se realizó en tres etapas. El primer paso es la síntesis de los *nanorods* de oro, AuRod en adelante, la segunda etapa es la formación de

⁹ El contenido de este capítulo ha sido adaptado de la siguiente publicación científica:

M. Lafuente, S. De Mercí, I. Pastoriza, J. Pérez-Juste, J. Santamaria, R. Mallada, M.P. Pina
“Core-shell MOF@Ag as efficient platforms for ultrasensitive SERS detection of chemical warfare agents in air”

En proceso de revisión.

los Au@Ag *core-shell* nanorods. Y finalmente, el recrecimiento de la carcasa de ZIF8 alrededor de los Au@Ag nanorods. A continuación, se detallan cada uno de los pasos:

- Síntesis de nanorods de oro, AuRods

Los AuRods fueron sintetizados siguiendo un protocolo previo [107]. Este protocolo usa la hidroquinona como agente reductor. Brevemente, el HAuCl₄ (0,4 mM), AgNO₃ (0,26 mM) y la hidroquinona (5,26 mM) fueron secuencialmente añadidos a 72,6 mL de una disolución de CTAB (0,1 M) bajo agitación suave.

- Síntesis de Au@Ag *core-shell* nanorods

Los Au@Ag *core-shell* nanorods fueron sintetizados siguiendo un protocolo previo con alguna pequeña modificación [116]. 10 mL de AuRods fueron lavados (8000 rpm, 20 min) tres veces con 10 mL de CTAC (80 mM) y redispersados en 40 mL de una disolución de CTAB (80 mM). Después, el ácido L-(+)-ascórbico (7,45 mM) y el AgNO₃ (0,745 mM) fueron añadidos secuencialmente bajo agitación. La reacción se mantuvo durante 3 h en un horno a 60 °C. Los Au@Ag nanorods fueron lavados dos veces con 10 mL de agua destilada a 7000 rpm durante 20 min, y redispersados en agua destilada con una concentración de CTAC 0,6 mM.

- Encapsulación de los Au@Ag nanorods en ZIF8

El recubrimiento de los Au@Ag nanorods con partículas de ZIF8 se basó en un protocolo previo ligeramente modificado [395]. 0,144 mL de CTAB (1 mM) fueron añadidos a 1 mL de una disolución acuosa de 2-metilimidazole (1,32 M). La disolución se agitó durante 5 min y entonces se añadió de manera consecutiva 1 mL de Zn(NO₃)₂·6H₂O (24 mM) y 1 mL de Au@Ag nanorods bajo una vigorosa agitación. Después de 5 min, la suspensión se dejó en reposo durante 3 h. El resultado fueron nanopartículas Au@Ag@ZIF8 *core-shell* que se lavaron una vez con 10 mL de metanol a 5000 rpm durante 5 min, y se redispersaron en 3,14 mL de metanol. La suspensión final tiene color verde.

- Síntesis de ZIF8

También se sintetizaron nanocristales de ZIF8 con morfología cúbica sin Au@Ag nanorods dentro para llevar a cabo ensayos de adsorción. Las nanopartículas de ZIF8 se prepararon añadiendo 30 mL de Zn(NO₃)₂·6H₂O (24 mM) y 30 mL de CTAB (0,5 mM)

en 30 mL de 2-metilimidazol (1,32 M) bajo una vigorosa agitación. Tras 2 h, las nanopartículas de ZIF8 se lavaron una vez con metanol y se redispersaron en 40 mL de metanol.

Para evaluar las propiedades de adsorción las nanopartículas de ZIF8 cúbicas fueron expuestas a una atmósfera saturada de DMMP siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.2.1.4, página 132. Además, diversas técnicas fueron utilizadas para caracterizar las nanopartículas Au@Ag@ZIF8. Para más información sobre las diferentes técnicas de caracterización ver Anexo I.

5.3.1.3 Preparación de los sustratos SERS

Las Au@Ag@ZIF8 se depositaron sobre sustratos de SiO₂/Si de 4 mm × 8 mm mediante *spin coating* de la suspensión de nanopartículas en metanol. El protocolo de espineado consta de dos etapas: *i*) 30 s a 500 rpm; *ii*) 60 s a 1000 rpm. El protocolo se repitió 4 veces dispersando en cada una de ellas 40 µL. Antes de la deposición de las Au@Ag@ZIF8, los sustratos se habían lavado de manera consecutiva con acetona, isopropanol y agua y secados bajo una corriente de N₂ seco.

Los experimentos de detección de DMMP se realizaron con el equipo Alpha 300 de sobremesa y el equipo Raman portable, la longitud de onda de excitación de 785 nm. Las condiciones de medida con el equipo de sobremesa fue el objetivo de 20x, una potencia del láser de 1,5 mW (0,52 mW/µm²) y un 1 s de tiempo de adquisición. En general, se realizaron *mappings* de 50 µm × 50 µm registrando 100 espectros. Las condiciones del equipo portable fueron 350 mW, 0,044 mW/µm², y 40 s de tiempo de adquisición.

5.3.1.4 Simulación de la isoterma de adsorción

La simulación fue realizada por el Dr. Miguel Urbiztondo del grupo NFP de la Universidad de Zaragoza. La simulación de la isoterma de adsorción de DMMP en la estructura del ZIF8 a 298 K fue realizada mediante combinación de simulaciones Monte Carlo (MC) usando el algoritmo Metropolis-Hastings [396] y cálculos de dinámica molecular utilizando UFF [397] como fuerza de campo. Se realizó un estudio de optimización, los mejores resultados se obtuvieron usando 30.000 pasos y 3 millones de puntos de equilibrio para cada paso.

5.3.2 Resultados

5.3.2.1 Caracterización de los sustratos SERS Au@Ag@ZIF8

La síntesis de los Au@Ag nanorods recubiertos de ZIF8, Au@Ag@ZIF8, se realizó en tres fases (Figura 5.22a). En la primera etapa se sintetizaron los *rods* de oro que serán el núcleo del resto de la partícula. La longitud de los AuRods fue de 73 ± 5 nm y el grosor de 11 ± 3 nm. La segunda etapa consistió en crecer una carcasa de Ag sobre el AuRod formándose dos rods concéntricos, el central de Au y el superficial de Ag, en adelante Au@Ag nanorods (Figura 5.22b). La longitud L de los Au@Ag nanorods fue de 81 ± 5 nm y el grosor G de 33 ± 2 nm. La desviación estándar de ambas magnitudes, L y G , fue de un 6% mostrando la homogeneidad de los Au@Ag nanorods sintetizados, así como, de la ruta de síntesis y que da lugar a un ratio L/G de 2,45.

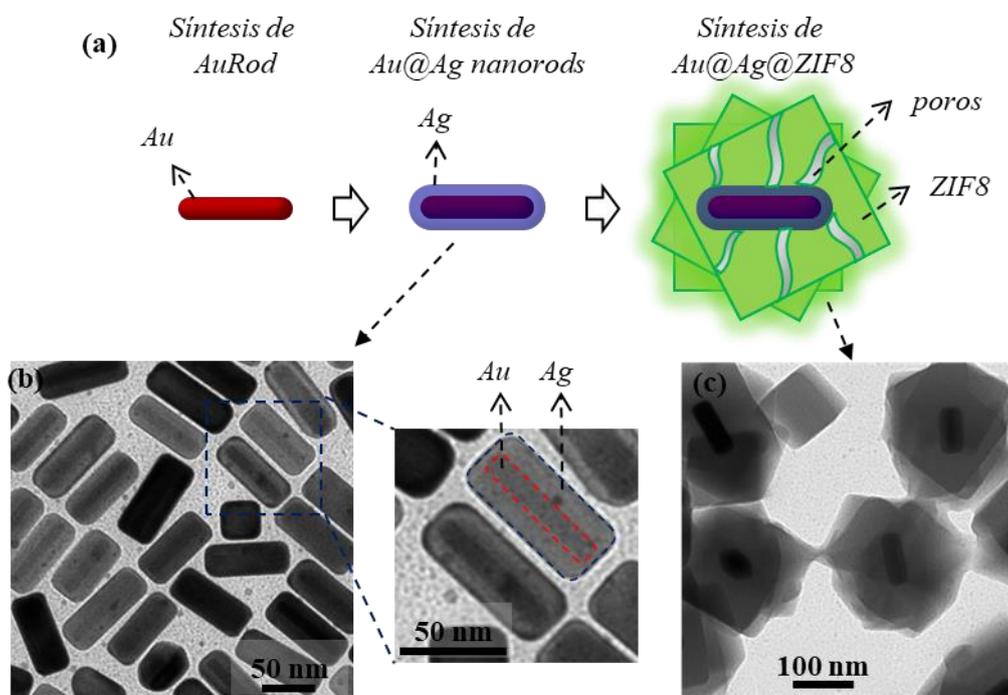


Figura 5.22 (a) Esquema de las tres etapas de la preparación de las nanopartículas Au@Ag@ZIF8. Imágenes TEM de (b) los Au@Ag nanorods sintetizados y (c) de las nanopartículas Au@Ag@ZIF8.

La tercera etapa de la síntesis fue la encapsulación de los Au@Ag nanorods en nanocristales de ZIF8. Las condiciones suaves de esta etapa permitieron que los Au@Ag nanorods sigan manteniendo su tamaño y morfología tras crecerles una carcasa de 90 ± 17 nm de ZIF8 alrededor (Figura 5.22c). El tamaño final de la nanopartícula

Au@Ag@ZIF8 fue de 241 ± 25 nm. Todos los tamaños han sido medidos de diferentes imágenes TEM ($N > 150$).

El espectro UV-Vis de los Au@Ag nanorods y Au@Ag@ZIF8 aparece en la Figura 5.23. El espectro de los nanorods muestra dos picos, uno centrado en torno a 400 nm y otro más intenso entorno a los 650-700 nm correspondientes al modo plasmónico transversal y longitudinal, respectivamente. La posición de los máximos se corresponde con lo reportado en literatura para nanorods con un ratio $L/G=2,45$ [398,399]. En Au@Ag@ZIF8 el desplazamiento hacia los rojos del plasmón superficial del modo longitudinal puede atribuirse al mayor tamaño de la nanopartícula tras el recubrimiento con el ZIF8 o al mayor índice de refracción del ZIF8 comparado con el agua [400].

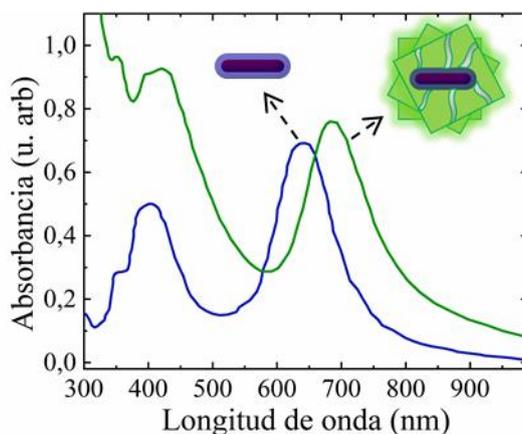


Figura 5.23 Espectro UV-Vis de los Au@Ag nanorods (azul) y las nanopartículas Au@Ag@ZIF8 (verde).

Los sustratos SERS fueron preparados por *spin coating* de la suspensión de Au@Ag@ZIF8, conforme se van realizando los diferentes espesados se observa como el soporte se va volviendo verde por las Au@Ag@ZIF8 depositadas. Las imágenes SEM de los sustratos SERS obtenidos se muestran en la Figura 5.24 demostrando que se pueden obtener sustratos homogéneos y bastante ordenados utilizando una técnica sencilla como el *spin coating*. En general, las nanopartículas Au@Ag@ZIF8 están formando una monocapa sobre el sustrato. Esta homogeneidad es crucial cuando los sustratos SERS van a ser utilizados como sensores SERS para obtener el mismo promedio de la señal en diferentes áreas.

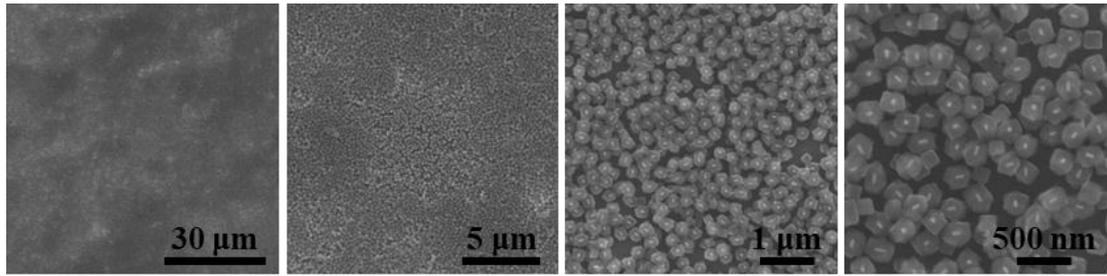


Figura 5.24 Imágenes SEM a diferentes magnificaciones del sustrato SERS Au@Ag@ZIF8.

5.3.2.2 Caracterización de las propiedades de adsorción del ZIF8

El material ZIF8 con morfología cúbica presenta un tamaño de cristal de 270 ± 66 nm y un volumen de poro de $0,7$ cm³/g, ver Figura 5.25a y b, respectivamente. El tamaño del poro, evaluado con el método HK con geometría cilíndrica *Saito and Foley*, es de 1,2 nm y se corresponde con el tamaño de la cavidad central de la estructura del ZIF-8, a la que se accede a través de unas ventanas de 3,6 Å [401]. La superficie específica calculada por el método BET y teniendo en cuenta el criterio de consistencia de Rouquerol [402,403] fue de 2000 m²/g.

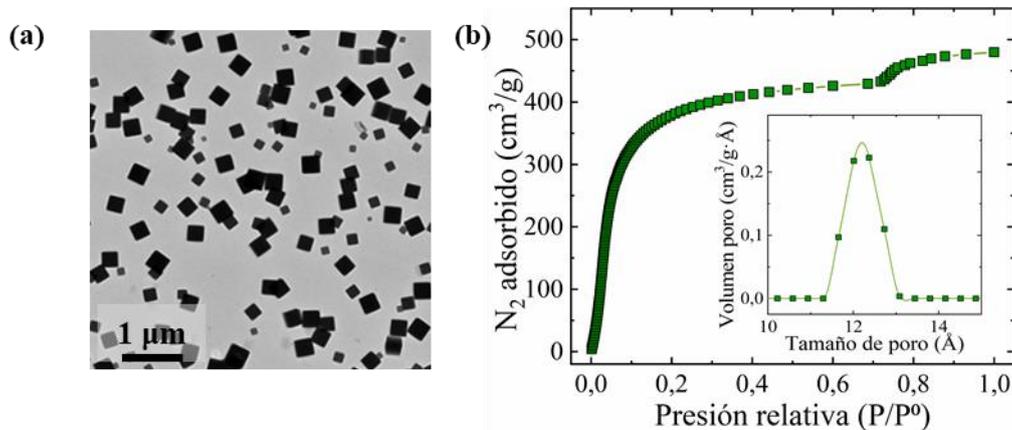


Figura 5.25 (a) Imagen SEM de las partículas de ZIF8 cúbico. (b) Isotherma de adsorción de N₂. Inserto: tamaño del poro del ZIF8.

Tras la adsorción de vapores de DMMP según lo descrito en el apartado 5.2.1.4 (pág. 132) se realizó un análisis termogravimétrico (Figura 5.26). En primer lugar, el experimento en blanco (línea negra), con el mismo proceso de secado en estufa, mostró una baja adsorción de agua, 12 mg/g_{ZIF8}, que se pierde a los 100°C. Tras saturar el material con DMMP (línea verde), podemos observar que el pico de desorción se desplaza ligeramente y se ensancha. Este pico corresponde a la desorción del DMMP y del agua, restando el agua del experimento en blanco, resulta una capacidad de adsorción de

DMMP de 83 mg/gr_{ZIF8}, la mitad de las nanopartículas de sílice mesoporosa MCM48 (197 mg/g_{MCM48}). La razón puede ser que el volumen de poro del ZIF-8 es un 35% menor y, además, aunque la estructura del ZIF-8 muestra una cierta flexibilidad, el acceso del DMMP, diámetro cinético de 5,7 Å [404], a las cavidades se realiza a través de las ventanas de 3,6 Å.

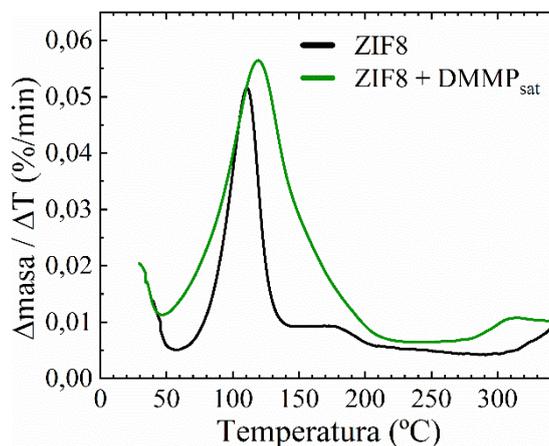


Figura 5.26 Análisis termogravimétrico de las nanopartículas de ZIF8 cúbico antes y después de ser expuesto a una atmósfera saturada de DMMP (739 ppmV).

5.3.2.3 Detección de DMMP en fase gas

El espectro Raman del DMMP puro, junto con los espectros SERS promedio recogidos sobre Au@Ag@ZIF8 en función del tiempo de exposición, a una concentración de DMMP de 2,5 ppmV, aparecen en la Figura 5.27a. Los espectros son el promedio de 100 espectros. El pico característico del DMMP a 710 cm⁻¹ y correspondiente al stretching del enlace PC se observa con claridad desde los primeros segundos de comenzar la alimentación de los vapores a la celda. El ZIF8 también tiene una serie de picos característicos marcados con el símbolo (•) en los espectros de la Figura 5.27a. El más importante el pico a 685 cm⁻¹ y correspondiente al fruncimiento del anillo de imidazol y la vibración de los hidrógenos fuera de plano [405]. A mayores frecuencias aparecen a 1145 y 1181 cm⁻¹ el stretching de lo enlaces C-N y C-N + N-H, respectivamente, a 1458 cm⁻¹ aparece el movimiento de los enlaces C-H y, finalmente a 1505 cm⁻¹ la vibración de los enlaces C-N. Asimismo, aparece una banda ancha característica del SiO₂/Si en torno a 941 cm⁻¹ y marcada en la Figura 5.27a con el símbolo (*).

Un análisis más detallado de la respuesta SERS en función del tiempo de exposición a los vapores de DMMP aparece en la Figura 5.27b. Cada mapa monitoriza la intensidad del pico a 710 cm^{-1} del DMMP en un área de $2500\text{ }\mu\text{m}^2$ recogiendo 100 espectros en función del tiempo de exposición a los vapores de DMMP. La intensidad y la densidad de la señal SERS aumenta conforme aumenta el tiempo de exposición a los vapores de DMMP debido al mayor número de molécula adsorbidas en el sustrato Au@Ag@ZIF8. Además, la capacidad de detección del sustrato Au@Ag@ZIF8 dentro de los 30 s se observa claramente en estos mapas de intensidad. La homogeneidad de la señal SERS en los mapas de intensidad es consecuencia de la alta homogeneidad de los recubrimientos de Au@Ag@ZIF8.

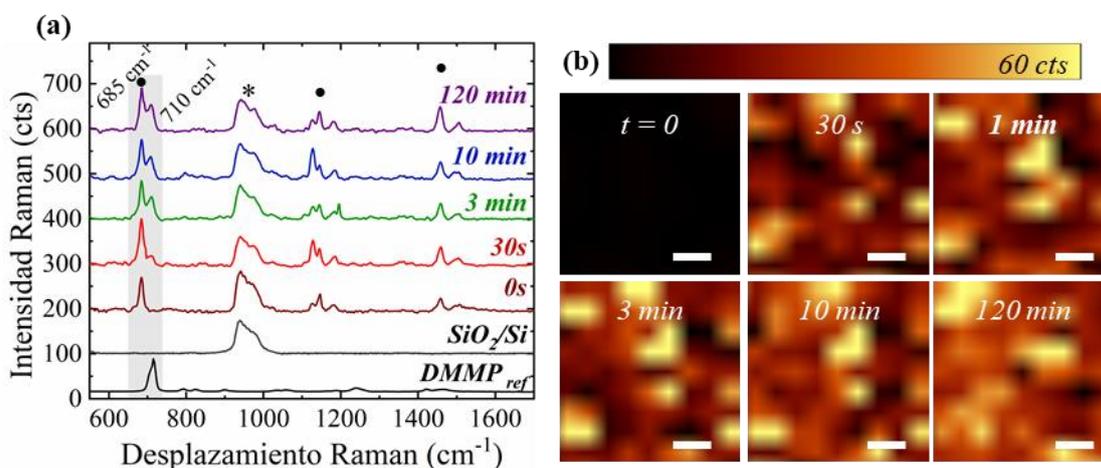


Figura 5.27 Detección de 2,5 ppmV de DMMP en fase gas utilizando los sustratos Au@Ag@ZIF8: (a) Espectro SERS promedio del DMMP recogido sobre Au@Ag@ZIF8 en función del tiempo de exposición a los vapores de DMMP junto con el espectro Raman del DMMP puro y el del soporte sólido SiO₂/Si. El área sombreada indica los picos principales del ZIF8 y el DMMP. Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados (b) Mapas de intensidad del pico a 710 cm^{-1} del DMMP en función del tiempo de exposición a los vapores de DMMP. La escala representa $10\text{ }\mu\text{m}$.

La homogeneidad de las nanopartículas Au@Ag@ZIF8 nos permitió utilizar la señal del pico a 685 cm^{-1} del ZIF8 como patrón interno, puesto que el número de moléculas adsorbidas es directamente proporcional a la adsorción en el recubrimiento de ZIF8 microporoso. En la Figura 5.27a podemos observar que la señal del ZIF8 permanece constante a los diferentes tiempos de exposición del sustrato a vapores de DMMP. La normalización de los experimentos se realizó calculando el ratio entre la señal de DMMP y la del ZIF8, es decir, la intensidad del pico a 710 cm^{-1} del DMMP dividida de la intensidad del pico a 685 cm^{-1} del ZIF8, I_{710}/I_{685} o $I_{\text{DMMP}}/I_{\text{ZIF8}}$.

Este ratio se utilizó para estudiar la cinética de adsorción del DMMP en el sustrato Au@Ag@ZIF8. La Figura 5.28 muestra el ratio de intensidad de los picos DMMP/ZIF8 en función del tiempo de exposición a los vapores de DMMP. Para presentar un dato estadístico relevante de las medidas realizadas, el experimento se repitió con 6 sustratos Au@Ag@ZIF8 diferentes. La metodología seguida fue la realización de *mappings* de intensidad de 100 μm^2 recogiendo 16 espectros cada 30 s durante los primeros 10 min y cada 5, 10 o 20 min hasta llegar a los 120 min que duro cada experimento. Como podemos observar el sustrato Au@Ag@ZIF8 rápidamente adsorbe las moléculas de DMMP aumentando la intensidad hasta estabilizarse a los 2 min. La homogeneidad del proceso de fabricación de los sustratos Au@Ag@ZIF8 se muestra en la baja RSD, un 6%, de la señal SERS entre los 6 sustratos medidos.

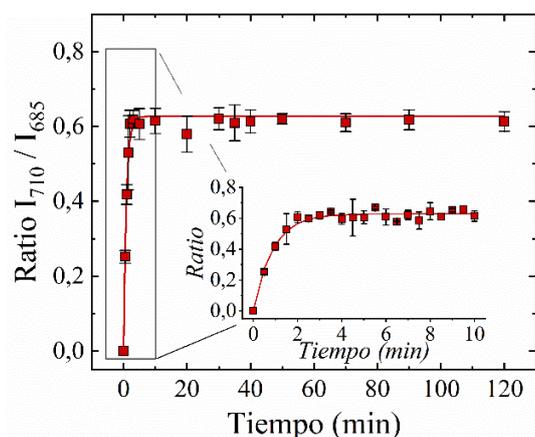


Figura 5.28 Ratio promedio de la intensidad DMMP/ZIF8 de 6 sustratos Au@Ag@ZIF8 en función del tiempo de exposición a los vapores de DMMP 2,5 ppmV. Las barras de error representan la desviación estándar. Inserto: magnificación de los primeros minutos de la adsorción de DMMP. Datos ajustados a la cinética de adsorción de Lagergren.

La adsorción del DMMP se ajustó a la cinética de pseudo primer orden de Lagergren, Ecuación 5.1, usado como modelo simplificado en la dinámica de adsorción, y que considera una fuerza de adsorción lineal dirigida por una fisisorción del analito en el adsorbente [366,406–408].

$$\frac{dR_t}{dt} = k \cdot (R_e - R_t) \quad \text{Ecuación 5.1}$$

Donde k (s^{-1}) es la constante cinética de adsorción de primer orden, R_e es el ratio de intensidad en el equilibrio y bajo las condiciones de contorno $t = 0$ con $R_t = 0$ y $t = t$ con $R_t = R$, de forma integrada tenemos la Ecuación 5.2:

$$R_t = R_e \cdot (1 - e^{-kt})$$

Ecuación 5.2

Ajustando los datos por mínimos cuadrados se obtuvo una $k = 1,9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Esta constante es del mismo orden, $k = 5,5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, que la obtenida en la detección de 4-metilbencenotiol utilizando una plataforma 3D de nanocubos de plata recubiertos por una capa de ZIF8 de $44 \pm 5 \text{ nm}$ [366].

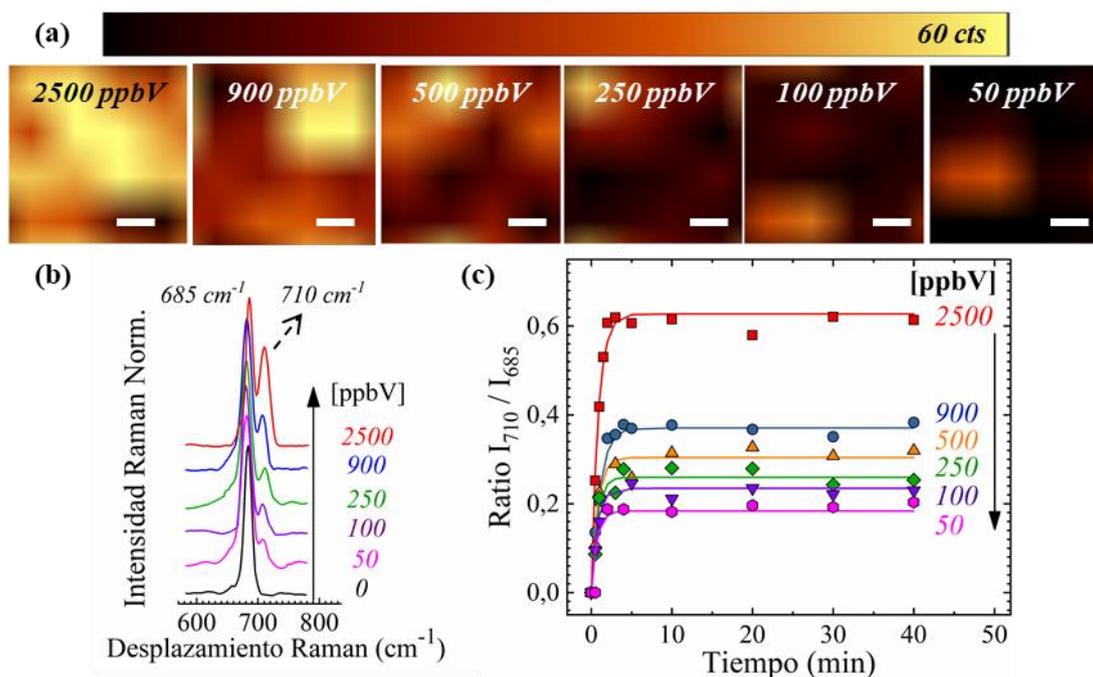


Figura 5.29 Detección de DMMP a bajas concentraciones: (a) mapa de intensidad SERS recogidos sobre Au@Ag@ZIF8 en función de la concentración de DMMP monitorizando el pico a 710 cm^{-1} . La escala representa $10 \mu\text{m}$. (b) Espectro Raman promedio de cada una de las áreas al tiempo de 10 min junto con el espectro del sustrato Au@Ag@ZIF8 antes de alimentar los vapores de DMMP. Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados (c) Ratio de la intensidad SERS de los picos DMMP/ZIF8 en función del tiempo de exposición a diferentes concentraciones de DMMP.

La Figura 5.29a muestra los *mappings* de intensidad del pico a 710 cm^{-1} al tiempo de 10 min para las diferentes concentraciones de DMMP alimentadas, asimismo, el espectro SERS promedio de estos mapas aparece en la Figura 5.29b. La intensidad SERS decrece cuando la concentración de DMMP disminuye, así como la densidad de señal SERS, ya que existen menos moléculas en la fase gas que puedan ser adsorbidas por el ZIF8. La RSD una vez estabilizada la señal se mantiene por debajo del 5% para las concentraciones más altas y aumenta hasta un 9% para las más diluidas. El estudio de la cinética de adsorción se repitió para todas las concentraciones alimentadas. La Figura

5.29c muestra que todas las concentraciones describen la misma cinética de adsorción definida por una k promedio de $1,66 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

La respuesta SERS de las moléculas de DMMP adsorbidas en los microporos de ZIF8 puede ser usada de manera cuantitativa por debajo de 1000 ppbV (Figura 5.30). La respuesta puede ser ajustada a una recta que sigue la expresión $ratio = 0,12 \cdot \log C - 0,03$. De acuerdo a esta curva de calibración el LOD del sensor es de 5,8 ppbV, inferior al AEGL3 (64 ppbV) para 10 min de exposición a vapores de gas Sarín, aceptado como el valor a partir del cual existen efectos potencialmente mortales o la muerte [409]. Aunque la sensibilidad es baja porque la pendiente de la recta es débil, la rápida respuesta de este sustrato SERS es una potencial característica para la detección temprana de gases neurotóxicos en fase gas.

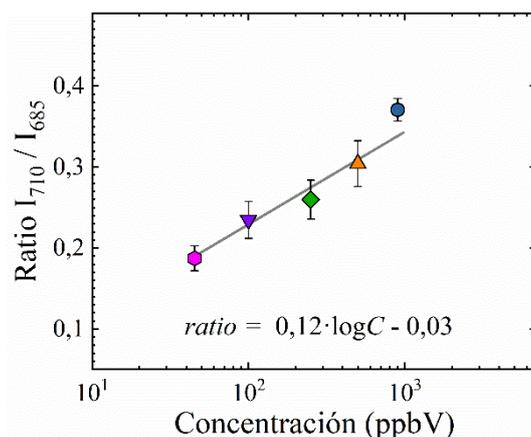


Figura 5.30 Ratio de la intensidad SERS de los picos DMMP/ZIF8 en función de la concentración de DMMP. Las barras de error representan la desviación estándar.

Considerando que a los 10 minutos se ha alcanzado el equilibrio de adsorción (Figura 5.29c), podemos representar estos ratios de concentración como una isoterma de adsorción de DMMP en ZIF8, Figura 5.31a. La forma de la curva se corresponde con la isoterma de llenado de un material microporoso a presiones relativas bajas, isoterma de Tipo I, como puede observarse al compararla con la isoterma de adsorción experimental de N_2 en cristales de ZIF8. También se calculó de manera teórica, a través de simulaciones con Montecarlo, la isoterma de adsorción de DMMP en ZIF8 (Figura 5.31) que confirma que a la máxima concentración estudiada 2500 ppbV, $P/P_0 = 2,3 \times 10^{-3}$ (ver Anexo V, pág. 270) se ha alcanzado la máxima capacidad de adsorción de DMMP en los microporos del ZIF8.

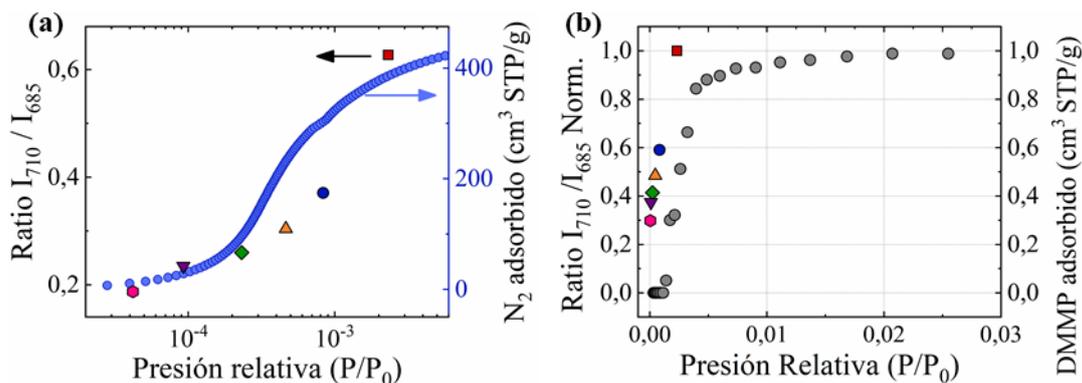


Figura 5.31 Ratio de la intensidad SERS de los picos DMMP/ZIF8 en función de la concentración de DMMP expresada como presión relativa comparado con la isoterma de adsorción experimental de N_2 en ZIF8 y con (b) la isoterma de adsorción teórica de DMMP en ZIF8.

Basándonos en los resultados de la TGA (Figura 5.26), se evaluó la regeneración del sustrato Au@Ag@ZIF8 tras calentarlo a 200 °C durante 1 h. El experimento consistió en exponer los sustratos a los vapores de 2,5 ppmV de DMMP durante dos horas, retirarlos de la celda de gases y calentarlos durante 1 h a 200 °C sobre una placa calefactora calibrada. Tras este tiempo, se monitorizó la señal del sustrato para comprobar que se había eliminado todo el DMMP. Finalmente, se realizó un segundo ciclo para verificar que las propiedades de adsorción del Au@Ag@ZIF8 se mantenían. El experimento se realizó con tres sustratos Au@Ag@ZIF8 diferentes. La Figura 5.32a muestra los mapas de intensidad del pico a 710 cm^{-1} del DMMP durante el primer ciclo de adsorción, tras la regeneración 200 °C, y durante segundo ciclo de adsorción de DMMP. Después de 1 h a 200 °C la intensidad SERS del DMMP ha desaparecido completamente y podemos decir que el sustrato Au@Ag@ZIF8 está regenerado.

Se midió el plasmón de absorción del sustrato para confirmar que las propiedades plasmónicas no se habían visto alteradas tras el calentamiento. Para ello se preparó un sustrato de Au@Ag@ZIF8 sobre pyrex y se midió el espectro UV-Vis antes y después de la etapa de regeneración (Figura 5.32b). Se observa que tras aplicar temperatura el SPR ha disminuido un poco de intensidad, pero el máximo de absorción se mantiene en la misma posición, 640 nm.

La Figura 5.32c muestra el ratio de la intensidad SERS en función del tiempo de exposición a los vapores de DMMP durante el segundo ciclo de adsorción. El nuevo valor de la constante cinética es ligeramente superior $k = 3,0 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ frente a $1,9 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ en el primer ciclo. Asimismo, podemos observar que durante este segundo ciclo la

desviación estándar en las medidas entre los sustratos ha aumentado hasta un 26%. Estos resultados nos indican que aunque la señal del DMMP desaparece tras la regeneración de los sustratos Au@Ag@ZIF8, es posible que no se haya desorbido completamente todo el DMMP. De acuerdo con los resultados de la TGA que muestra un segundo pico a 300 °C (ver Figura 5.26). Esto de lugar a una cinética más lenta y a una peor reproducibilidad de las medidas.

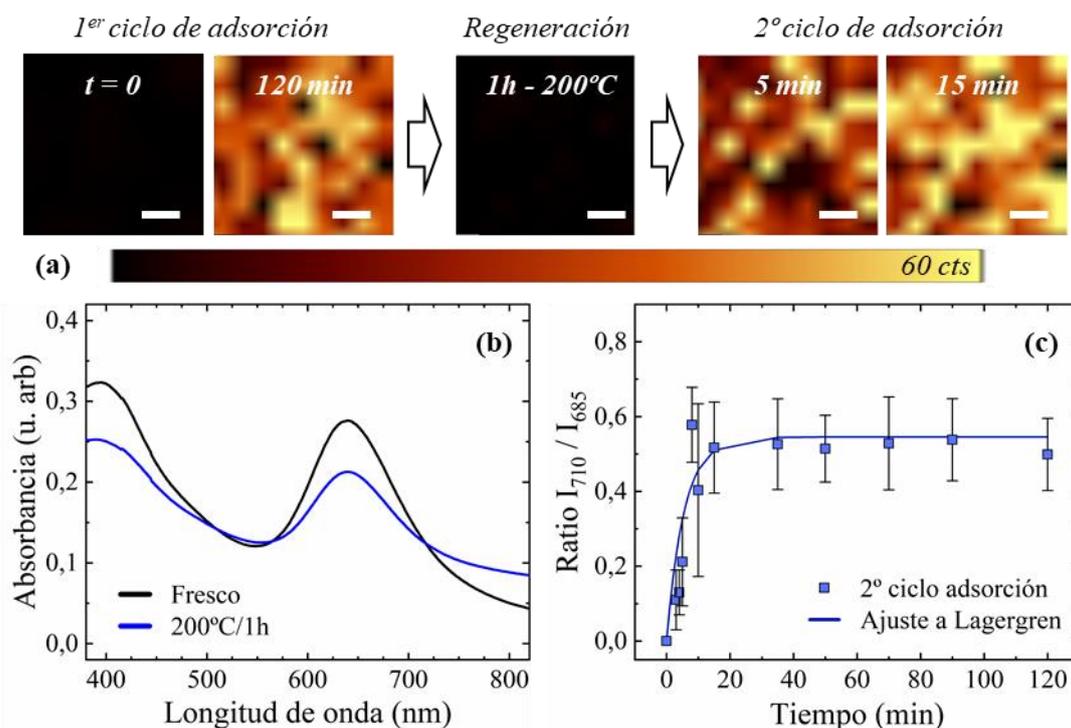


Figura 5.32 Regeneración del sustrato Au@Ag@ZIF8. (a) Mapas de intensidad monitorizando el pico a 710 cm^{-1} del DMMP durante el primer ciclo de adsorción, tras la regeneración a $200^\circ\text{C}/1\text{h}$ y durante el segundo ciclo de adsorción. La escala representa $10\ \mu\text{m}$. (b) Espectro promedio (10 medidas) UV-Vis del sustrato fresco y tras la regeneración. (c) Ratio promedio DMMP/ZIF8 de 3 sustratos Au@Ag@ZIF8 durante el segundo ciclo de adsorción de $2,5\ \text{ppmV}$ de DMMP. Las barras de error representan la desviación estándar para los valores medidos en 3 sustratos. Datos ajustados a la cinética de adsorción de Lagergren.

También se estudió la estabilidad temporal del sustrato Au@Ag@ZIF8. Para ello se dejaron envejecer a temperatura ambiente y oscuridad varios sustratos no usados de pyrex recubiertos de Au@Ag@ZIF8 durante 24 h, 20 y 60 días. Tras este tiempo, se les midió el espectro de absorción UV-Vis. La Figura 5.33a muestra el SPR de estos sustratos tras el periodo de envejecimiento indicado, cada espectro es el promedio de 10 medidas. Con el paso del tiempo el máximo de adsorción se desplaza ligeramente hacia los rojos desde 640 nm hasta 654 nm pasados 60 días. La constante cinética del sustrato envejecido es

ligeramente inferior, $k = 1,0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, a la obtenida con los sustratos frescos ($k = 1,9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$).

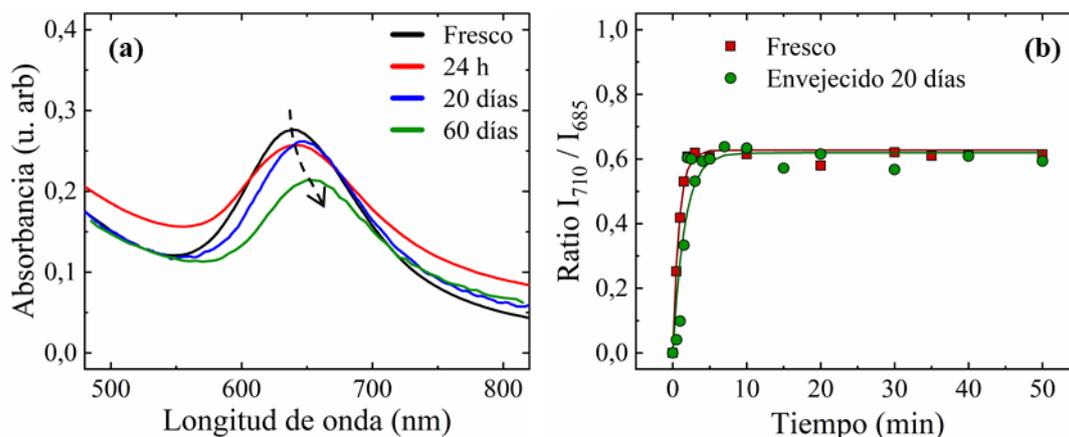


Figura 5.33 Envejecimiento del sustrato Au@Ag@ZIF8. **(a)** Espectro UV-Vis (promedio de 10 medidas) de los sustratos frescos y tras envejecerlos a diferentes tiempos. **(b)** Ratio promedio DMMP/ZIF8 de un Au@Ag@ZIF8 fresco y otro envejecido 20 días, ambos en función del tiempo de exposición a 2,5 ppmV de DMMP. Datos ajustados a la cinética de adsorción de Lagergren.

Finalmente, evaluamos el concepto de sensor SERS para la detección de agentes neurotóxicos midiendo los sustratos con el equipo Raman portable. La Figura 5.34a muestra el espectro SERS del DMMP recogido sobre el sustrato Au@Ag@ZIF8 en función del tiempo de exposición a los vapores de 2,5 ppmV de DMMP. El pico del DMMP desplazado a 710 cm^{-1} y correspondiente a la vibración del enlace PC se observa de manera clara desde la primera medida sobre el sustrato Au@Ag@ZIF8. El ensanchamiento de los picos se debe a la menor resolución espectral del espectrofotómetro del equipo Raman portable (6 cm^{-1} vs. 2 cm^{-1}).

Ajustando los datos de la Figura 5.34c a la cinética de Lagergren (Ecuación 5.2) obtenemos una constante cinética de adsorción de $k = 3,3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. De estos datos también calculamos el $t_{50\%}$ y el $t_{90\%}$ que se definen como el tiempo que cuesta alcanzar el 50% y el 90% de la intensidad final, en este caso el ratio final, respectivamente, y que fueron $t_{50\%} = 21 \text{ s}$ y $t_{90\%} = 78 \text{ s}$. Este valor de tiempo de respuesta es claramente inferior al obtenido con los Ag nPlates@grafito, $t_{50\%} = 137 \text{ s}$, y con las Au@MCM, $t_{50\%} = 120 \text{ s}$, midiéndolos con el equipo Raman Portable. Probablemente, en el caso de la Au@MCM se deba a que el llenado de la partícula se produce de dentro hacia afuera y es fuera donde se encuentra el material plasmónico. Y en el caso de Ag nPlates@grafito al no tener

material adsorbente/concentrador necesitan más tiempo acumulando partículas en la superficie antes de poder detectarlas.

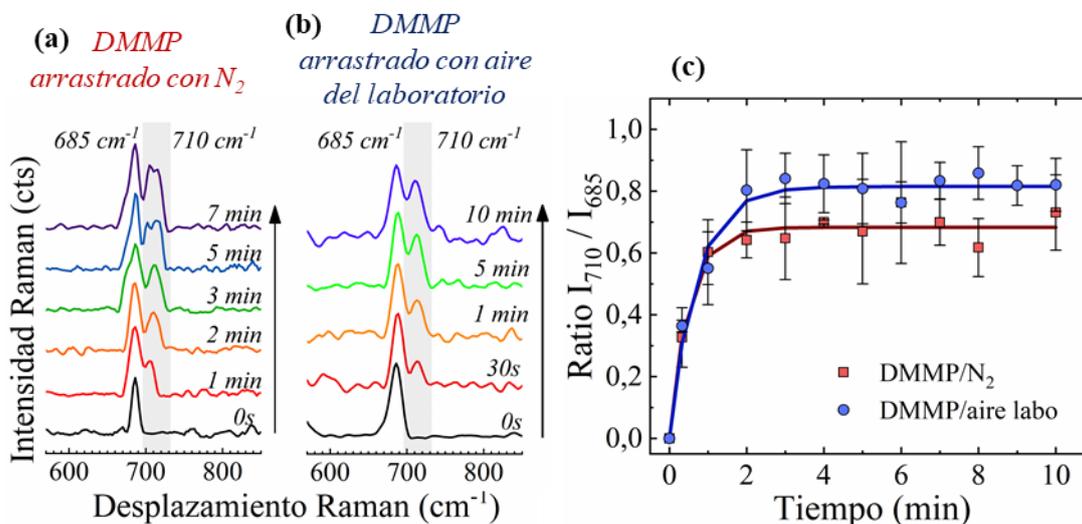


Figura 5.34 Detección de DMMP 2,5 ppmV con el equipo Raman portable. Espectros SERS promedio recogidos sobre Au@Ag@ZIF8 a diferentes tiempos de exposición de DMMP arrastrado con (a) N₂ y (b) aire del laboratorio. Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados (c) Ratio promedio DMMP/ZIF8, de la medida en tres sustratos, en función del tiempo de exposición a 2,5 ppmV de DMMP arrastrado con N₂ y aire del laboratorio. Datos ajustados a la cinética de adsorción de Lagergren.

Para evaluar el efecto de posibles interferencias con otras moléculas se realizó un experimento diluyendo el DMMP directamente con aire del laboratorio en lugar de N₂ puro. El aire del laboratorio tenía una humedad relativa de entre el 44-46%, CO, CO₂ y posibles trazas de otros compuestos orgánicos volátiles presentes en el laboratorio. El experimento se repitió tres días diferentes y con tres sustratos distintos. Los espectros de 2,5 ppmV de DMMP recogidos sobre Au@Ag@ZIF8 (Figura 5.34b) muestran claramente, desde el primer espectro recogido a los 30 segundos la señal característica del DMMP a 710 cm⁻¹. El espectro no se ve alterado por la presencia de humedad ambiental y otras moléculas comunes en el aire de laboratorio. Sin embargo, sí que se observa una mayor relación señal-ruido respecto al espectro medido en nitrógeno. La RSD de la señal fue de un 12% mostrando la robustez de la medida con estos sustratos. El t_{50%} y el t_{90%} se calculó a partir de los datos de la Figura 5.34c en 29 s y 103 s, respectivamente.

5.3.2.4 Detección de CEES en fase gas

Finalmente, se amplió el estudio con este mismo equipo portable, y con cuatro sustratos diferentes, para la detección de 76 ppbV de 2-cloroetilsulfuro, simulante del gas lacrimógeno mostaza. En la Figura 5.35a podemos observar el modo vibracional del CEES correspondiente a la combinación del *bending* del enlace C-S y del *stretching* del C-S-C aparece ligeramente desplazado de 650 cm^{-1} a 635 cm^{-1} , que aparece desde el primer minuto en que se alimentan los vapores. Esta banda fue la que seleccionamos para calcular el ratio de intensidades y así normalizar los resultados, ratio $\text{CEES}_{635}/\text{ZIF8}_{685}$ y su evolución con el tiempo se muestra en la Figura 5.35b. La RSD de la señal fue de un 22%, más elevada que en el caso de la detección de DMMP.

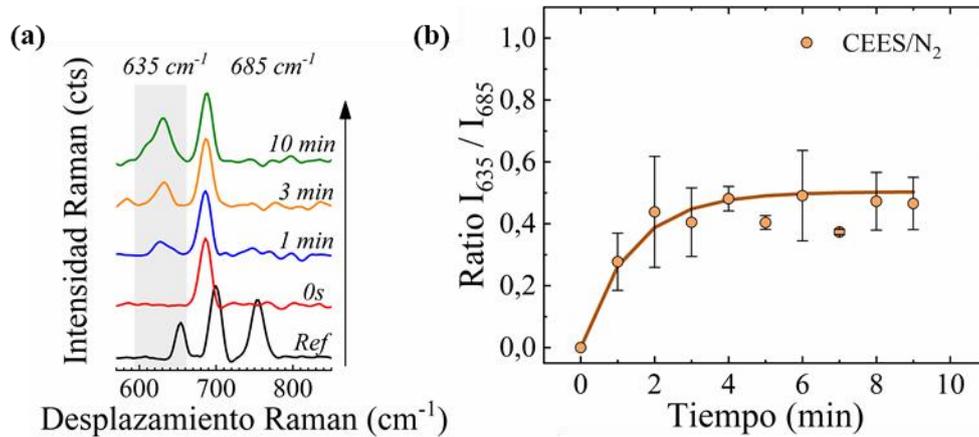


Figura 5.35 Detección de CEES con el equipo Raman portable. (a) Espectros SERS promedio recogidos sobre Au@Ag@ZIF8 a diferentes tiempos de exposición a vapores de 76 ppbV de CEES junto con el espectro del CEES puro. Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados. La zona sombreada señala el pico principal del CEES. (b) Ratio promedio CEES/ZIF8 en función del tiempo de exposición a los vapores de CEES. Datos ajustados a la cinética de adsorción de Lagergren.

La constante cinética de adsorción de $k = 1,2 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$, del mismo orden de magnitud, pero más baja que la obtenida en la detección de DMMP, $k = 3,3 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ resultando en unos valores del $t_{50\%}$ y $t_{90\%}$ superiores 54 s y 218 s, respectivamente. Estos resultados nos indican que la difusión del CEES a través de los poros del ZIF8 en comparación con la del DMMP es más lenta (DMMP $t_{50\%} = 21\text{ s}$). El diámetro cinético del CEES es $5,8\text{ \AA}$ [410], casi igual que el DMMP ($5,7\text{ \AA}$), y ambas son hidrófobas al igual que los poros del ZIF8 [411] por lo que ambas interacciones estarán favorecidas, pero a diferencia del DMMP que es una molécula compacta el CEES es lineal. Está reportado que a igualdad de condiciones (adsorbente y tamaño y naturaleza del adsorbato) las

moléculas lineales se adsorben más lentamente en materiales porosos que las compactas [404]. Está puede ser la razón del menor tiempo de respuesta del sensor Au@Ag@ZIF8 en la detección de DMMP en comparación con el CEES.

5.3.2.5 Análisis comparativo de la detección de DMMP y CEES

En la Figura 5.36a aparecen comparados los espectros recogidos con el equipo Raman portable sobre el Au@Ag@ZIF8 cuando se alimenta DMMP arrastrado con N₂ y aire y CEES en N₂. Los picos del DMMP y el CEES aparecen en diferente posición y sin solaparse con el ZIF8 lo que nos permitiría detectarlos en caso de tener mezclas de gases. Asimismo, la presencia de humedad u otras especies gaseosas no afectan a la detección de bajas concentraciones de DMMP.

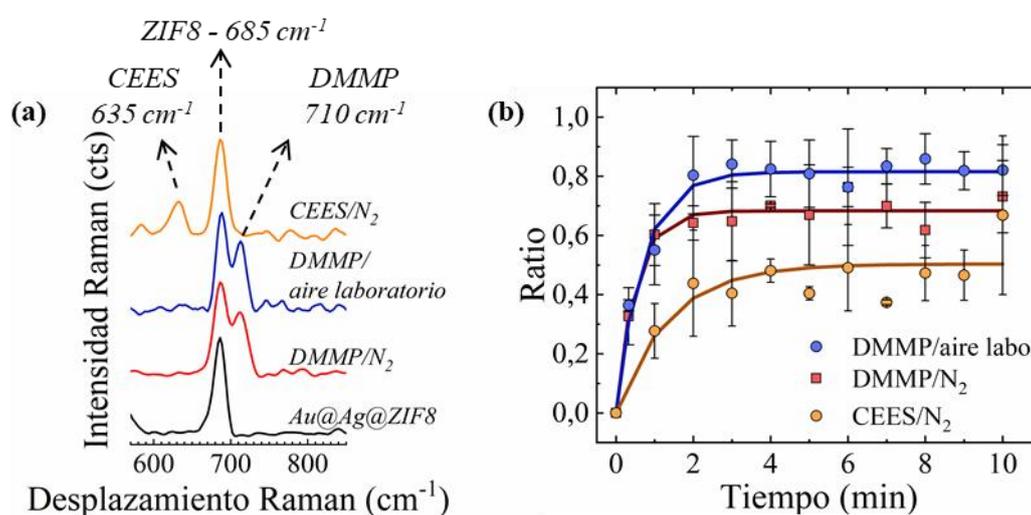


Figura 5.36 Resumen de la detección con el equipo Raman portable: (a) Espectros SERS promedio recogidos sobre Au@Ag@ZIF8 de 2,5 ppmV de DMMP arrastrado con N₂ y aire y 76 ppbV de CEES. Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados. (c) Ratio promedio en función del tiempo de exposición a los vapores de DMMP y CEES. Datos ajustados a la cinética de adsorción de Lagergren.

En la Figura 5.36b aparecen las cinéticas de adsorción en función del tiempo para los mismos tres experimentos. Los parámetros más importantes de cada detección se detallan en la Tabla 5.2. El resultado más destacado es que en menos de 60 s seríamos capaces de detectar ambos gases tóxicos, siendo la adsorción del DMMP más rápida que la del CEES, $t_{50\%}$ 21 s y 52 s, respectivamente. Por otro lado, la RSD de la señal nos confirma que podríamos usar los sustratos Au@Ag@ZIF8 como sensores SERS de compuestos tóxicos en fase gas.

Tabla 5.2 Resumen de los resultados obtenidos en la detección de DMMP y CEES con el equipo Raman Portable

Molécula/ gas arrastre	Parámetros medidos con el equipo Raman portable				
	Concentración alimentada	Desviación estandar relativa, RSD	Constante cinética de adsorción (s^{-1})	$t_{50\%}$	$t_{90\%}$
DMMP/N ₂	2500 ppbV	13%	$3,3 \times 10^{-2}$	21 s	78 s
DMMP/Aire laboratorio	2500 ppbV	12%	$2,4 \times 10^{-2}$	29 s	103 s
CEES/N ₂	76 ppbV	22%	$1,2 \times 10^{-2}$	54 s	218 s

5.4 CONCLUSIONES

En este capítulo se han desarrollado sustratos SERS basados en nanopartículas *core-shell* que combinan las propiedades plasmónicas de las nanopartículas de oro con las propiedades adsorbentes de los materiales meso- y microporosos.

La primera plataforma ha consistido en un núcleo de sílice mesoporosa, MCM48, sobre la que se crecieron nanopartículas de oro. La etapa crítica fue el recrecimiento de las semillas de oro, previamente ancladas a la MCM48, para alcanzar AuNP individuales con las adecuadas propiedades plasmónicas y sin tapar la entrada a los poros de la partícula de MCM48, los mejores resultados se obtuvieron para un tiempo de recrecimiento de 50 min.

En la segunda plataforma preparamos la configuración opuesta, el núcleo fueron nanorods de Au-Ag recubiertos por una *shell* de ZIF8 microporoso. Las nanopartículas Au@Ag@ZIF8 fueron sintetizadas en tres etapas: *i*) síntesis de nanorods de Au; *ii*) crecimiento de un rod de Ag concéntrico al de Au, formándose el Au@Ag nanorods; y *iii*) encapsulamiento de los Au@Ag nanorods en monocristales de ZIF8. Las nanopartículas Au@Ag@ZIF8 se depositaron sobre chips de SiO₂/Si mediante *spin coating* obteniéndose recubrimientos homogéneos y reproducibles.

Ambas nanopartículas, Au@MCM y Au@Ag@ZIF8, se depositaron mediante *spin coating*, obteniéndose sustratos SERS robustos, homogéneos y reproducibles. Esta homogeneidad junto con la de las propias nanopartículas permitió que la señal del

material poroso fuera utilizada como patrón interno, normalizando la intensidad del pico del agente tóxico.

La plataforma Au@MCM ha permitido detectar la huella dactilar completa del DMMP en concentraciones de hasta 50 ppbV. Hay que destacar que el sustrato SERS de las Au@MCM fue un chip de microfluídica compacto fabricado en silicio en el que los gases se alimentaban directamente en su interior. La adsorción del DMMP es reversible pudiendo utilizarse la plataforma múltiples veces, y con un tiempo de respuesta de 120 s. También, se ha demostrado que las Au@MCM basadas en sílice mesoporosa tienen una capacidad de detección 10 veces superior a la plataforma Au@Stöber que se basa en nanopartículas de sílice densa.

De igual modo, los sustratos Au@Ag@ZIF8 han permitido detectar DMMP en concentraciones tan bajas como 50 ppbV. Los sustratos Au@Ag@ZIF8 fueron caracterizados en condiciones experimentales más cercanas a la aplicación final, es decir, utilizando el equipo Raman portable y arrastrando el DMMP con aire del laboratorio. En estas condiciones se obtuvo una señal clara del DMMP sin interferencia por parte del resto de especies presentes en el aire, principalmente la humedad. El tiempo de respuesta del sustrato en estas condiciones fue de 29 s. La robustez de la señal y de la detección se ha demostrado al obtenerse $RSD < 13\%$ en todos los experimentos realizados. Finalmente, se estudiaron las capacidades de detección del Au@Ag@ZIF8 frente a otros gases tóxicos. El sustrato Au@Ag@ZIF8 fue capaz de detectar 76 ppbV de CEES, simulante del gas lacrimógeno mostaza, en 54 s y utilizando el equipo Raman portable.

Estos resultados demuestran las altas capacidades de detección de las nanopartículas plasmónicas combinadas con materiales adsorbentes. Las posibles desventajas podrían ser que la preparación de las Au@MCM es larga y laboriosa, pero muy reproducible si se siguen los pasos al detalle. En el caso de la plataforma Au@Ag@ZIF8 al regenerar el sustrato aumenta la desviación estándar de la medida y aumenta ligeramente el tiempo de respuesta.

Capítulo VI

SUSTRATOS SERS BASADOS EN NANOESTRUCTURAS DE ORO PREPARADAS POR METODOLOGÍA *TOP-DOWN*

Resumen

En este capítulo se han fabricado sustratos SERS basados en nanoestructuras de oro ordenadas sobre nanotrincheras de silicio. Controlando el grosor de la capa de oro y el tiempo del grabado por haz de iones (IBE) se ha conseguido generar nanoestructuras de oro simétricas y no-simétricas alrededor del hot-spot. En las primeras el origen del aumento de la señal es el acoplamiento de los plasmones de nanoestructuras adyacentes. En las no-simétricas es el sumatorio de este efecto con el efecto antena que se produce sobre las nanoestructuras de oro de mayor tamaño, alcanzando un AEF de 6.9×10^6 . Todos los sustratos SERS han sido analizados de manera experimental a través del AEF y de manera teórica con simulaciones FDTD. Además, se ha realizado un estudio preliminar sobre la dependencia del espaciado entre nanoestructuras y la profundidad de la nanotrinchera de silicio.

El contenido de este capítulo ha sido adaptado de la siguiente publicación científica:

M. Lafuente, P. Muñoz, E.J.W Berenschot, R.M. Tiggelaar, A. Susarrey-Arce, S.M. García-Blanco, R. Mallada, M.P. Pina, Niels. R. Tas.

“Exploring the Surface Enhanced Raman scattering activity of gold nanostructures around nanogaps”

En proceso de escritura

6 SUSTRATOS SERS BASADOS EN NANOESTRUCTURAS DE ORO PREPARADAS POR METODOLOGÍA *TOP-DOWN*

Este capítulo se desarrolló durante una estancia de investigación en la Universidad de Twente, Países Bajos, entre el 30 de junio y el 2 de octubre de 2018. El trabajo se realizó entre los grupos de investigación *Mesoscale Chemical Systems* (MCs) liderado por el Dr. Han Gardeniers y el grupo *Optical Sciences* liderado por el Dr. Herman Offerhaus, asimismo, durante este periodo mi supervisor fue Dr. Niels Tas, investigador principal del grupo MCs.

6.1 INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores hemos estudiado sustratos SERS *bottom-up*, es decir, basados en el autoensamblaje de nanopartículas plasmónicas a un soporte sólido. En estos sustratos la amplificación del campo electromagnético tiene su origen en los plasmones generados sobre las nanopartículas o en el acoplamiento de plasmones de partículas adyacentes [38,39]. Desde este punto de vista, los plasmones o *hot-spots* generados están distribuidos de manera uniforme pero aleatoria por toda la superficie [74–77,155]. Por el contrario, si queremos tener un control preciso de la localización de estos *hot-spots* tenemos que recurrir a los sustratos *top-down*. La nanofabricación nos permite crear los espaciados con las dimensiones adecuadas para concentrar y convertir la luz en campos electromagnéticos localizados [75].

Como ya hemos avanzado en la introducción existen diferentes técnicas de nanofabricación. En este trabajo para fabricar las nanoestructuras hemos utilizado la litografía por desplazamiento Talbot (DTL, de su siglas en inglés *Displacement Talbot Lithography*) seguida de un ataque anisotrópico y selectivo del silicio. La litografía DTL es una variante de la litografía por interferencia láser y se basa en el efecto Talbot de difracción del campo cercano [412]. Brevemente, cuando una onda plana incide sobre una red de difracción periódica (máscara de litografía), la imagen de la red se repite a distancias regulares lejos del plano de ésta. Esto ha convertido a la litografía DTL en una tecnología de nanolitografía emergente, mediante la cual se pueden obtener nanoestructuras ordenadas con dimensiones inferiores a 100 nm y a escala de oblea,

utilizando una máscara y un haz de luz monocromático [274,413–415]. El oro se depositó mediante *sputtering* y las dimensiones finales de la capa se controlaron mediante un grabado por haz de iones (IBE).

Al tratarse de nanoestructuras uniformes y periódicas los resultados experimentales pudieron ser estudiados mediante simulaciones teóricas a través del método FDTD. Las simulaciones FDTD estudian la distribución del campo electromagnético local que se produce sobre las nanoestructuras cuando son iluminadas por un haz de luz monocromático (láser). Estas simulaciones nos permiten interpretar y predecir los resultados experimentales ayudándonos a entender el origen del efecto SERS que se produce en un determinado sustrato SERS.

6.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.2.1 Materiales

El ácido nítrico fumante (HNO_3 , 99%) se compró a KMG Ultra Pure Chemicals. El ácido fluorhídrico (HF) y el ácido fluorhídrico tamponado (BHF) se compraron en Technic. El hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) y el hidróxido de potasio (KOH) se compró a Merck. El ácido clorhídrico (HCl, 36%), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 31%), el ácido fosfórico (H_3PO_4 , 85%) y el ácido nítrico (HNO_3 , 69%) se compraron en BASF. La resina para la litografía óptica resist Olin 907-17 se adquirió a FujiFilm. La fotoresina PFI88 y el acetato de propilenglicol metil eter (PGMEA) se adquirieron en Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Las obleas de silicio (100) dopadas con antimonio se compraron a Okmetic, se trata de obleas pulidas por una cara con un diámetro de 100 mm, 525 μm de espesor y una resistividad de 0,005-0,025 Ω . La nanofotolitografía DTL se realizó con el equipo PhableR 100C de Eulitha.

6.2.2 Fabricación de las nanoestructuras de oro

La fabricación de las estructuras se realizó con la colaboración del Ing. [Erwin Berenschot](#) y el Dr. [Roald Tiggelaar](#) pertenecientes al grupo MCs. A continuación, se enumeran los pasos seguidos en la fabricación de las nanoestructuras, la explicación de cada etapa aparece en el apartado 6.3.1, pág. 178.

- Fabricación de las nanotrincheras en la oblea de silicio

Las obleas de silicio (100) se limpiaron dos veces con HNO₃ fumante (5 min) y el óxido nativo se retiró por inmersión en HF 1% (1 min). La primera generación de trincheras en forma de V se fabricó siguiendo el siguiente protocolo (ver Figura 6.1, pág. 179):

En primer lugar, una capa de nitruro de silicio estequiométrico (Si₃N₄) de 13,0 ± 0,1 nm fue depositada mediante deposición química de vapor a baja presión (LPCVD, de sus siglas en inglés *low-pressure chemical deposition*). El grosor de la capa se midió por elipsometría utilizando un equipo Woollam M-2000UI. Las estructuras Vangbo¹⁰ se alinearon en la capa de Si₃N₄ combinando una litografía óptica estándar y un ataque húmedo con BHF (28 min) [416]. Este patrón se transfirió a la oblea de silicio mediante un ataque químico con TMAH (25% en peso) de 34 min a 70°C.

Posteriormente, una máscara con motivos lineales (anchura 250 nm y espaciado 500 nm) fue alineada con los planos del silicio mediante la técnica de nanofotolitografía “*Displacement Talbot Lithography*” (DTL) [413,417–419]. La DTL, permitió transferir el patrón con líneas paralelas a la fotoresina PFI88 (1:1 FPI:PGMEA) [420], previamente espineada. Seguido, este patrón fue transferido al recubrimiento antirreflejante (BARC de sus siglas en inglés *bottom anti-reflection coating*, AZ barli-II 200) situado debajo de la fotoresina mediante un grabado reactivo iónico (RIE, de sus siglas en inglés *reactive ion etching*) direccional con plasma de N₂ (50 mTorr, 50 sccm de N₂, 8,5 min con un equipo casero) [417,420]. Después, la capa de Si₃N₄ fue selectiva y direccionalmente atacada con un RIE de CHF₃-O₂ (10 mTorr, 25 sccm CHF₃, 5 sccm O₂, 25W, 60 s) usando como máscara el recubrimiento de la fotoresina-BARC. Tras esto, el recubrimiento fotoresina-BARC fue retirado mediante un plasma de O₂ (30 min), seguido de dos inmersiones de 5 min en HNO₃ fumante, y el SiON y/o óxido crecido en la interfase fue eliminado por inmersión en BHF (2 min). Finalmente, el patrón de Si₃N₄ sirvió de máscara dura para el grabado anisotrópico del silicio con KOH (20% en peso) a temperatura ambiente y durante 5,5 min. De este modo se fabricó la primera generación de trincheras en forma de V con una anchura de 172 nm y un espaciado entre trincheras de 68 nm (ver Figura 6.1b, página 179). Para eliminar los restos alkali que pudieran

¹⁰ Las estructuras Vangbo se utilizan para determinar de manera exacta la orientación de los planos cristalográficos de las obleas de silicio permitiendo el alineamiento preciso de las máscaras sobre las obleas.

quedar la oblea fue tratada con la mezcla RCA-2 durante 15 min a 80°C. RCA-2 es una mezcla de HCl:H₂O₂:agua destilada en un ratio v/v de 1:1:5.

La segunda generación de trincheras en V fue fabricada en el espaciado plano entre las trincheras de la primera generación. Este paso se realizó mediante una oxidación local del silicio (LOCOS, de sus siglas en inglés *Local Oxidation of Silicon*) combinada con un ataque anisotrópico, siguiendo un protocolo previo del grupo MCs [420]. La oxidación húmeda a 800°C (15 min) permitió crecer una capa de SiO₂ de $7,9 \pm 0,4$ nm sobre el Si (111), paredes de las trincheras en V, mientras que sobre el Si (100) que recubre la capa de Si₃N₄ creció una capa de menor espesor, $5,7 \pm 0,3$ nm. Una inmersión de 15 s en HF 1% fue utilizada para retirar la capa de SiO₂ crecida sobre el Si₃N₄, y otra de 18 min en H₃PO₄ a 140°C para retirar la de Si₃N₄. La capa de oxido situada bajo el Si₃N₄ fue retirada a través de un tratamiento con O₃ (5 min) y una inmersión en HF 1% (11 s). Este tratamiento también conllevó la hidrofobación de la oblea de silicio. A continuación, el silicio expuesto fue atacado con TMAH (25% en peso, 70°C) con una velocidad en el plano Si (111) de 1,25 nm/min. Tras 12 min, la anchura de la segunda generación de trincheras en V fue de $116,0 \pm 2,0$ nm. Este ataque también afectó a la primera generación que pasó de tener una anchura de 172 nm a la final de $125 \pm 2,0$ nm (ver Figura 6.1, página 179). Tras el ataque con TMAH, la capa de SiO₂ fue retirada con HF 50% (1 min).

Las puntas de las trincheras fueron afiladas mediante una oxidación seca a 900°C durante 55 min. Esta oxidación creció una capa de 23 nm de SiO₂ sobre el Si (111) que fue retirada por inmersión en HF 50% durante 30 s. A continuación, la oblea fue reoxidada a 800°C (5 min) para crecer una capa de SiO₂ de $3,5 \pm 2,0$ nm y evitar la posible formación de especies Au-Si.

Además, la parte trasera de la oblea fue grabada con surcos de 275 μm de profundidad para facilitar el corte de la oblea en sustratos de 10 × 10 mm. Para ello, las trincheras fueron protegidas con la resina Olin 905-38, posteriormente retirada por inmersión HNO₃ fumante (15 min). Los restos del corte fueron eliminados lavando con agua destilada en un baño de ultrasonidos (15 min).

- Fabricación de las nanoestructuras de oro sobre las trincheras de silicio

Antes de depositar el oro (Au) la oblea fue lavada con HNO₃ fumante (2 × 5 min) y con HNO₃ 69% en ebullición. También fue depositada por *sputtering* una capa de cromo (Cr) de 2 nm ($6,6 \times 10^{-3}$ mbar, 100 W y 20 s) con un equipo casero.

El primer paso en la fabricación de las nanoestructuras de Au fue la deposición por *sputtering* de la capa de Au, 50 nm (100 W, 120 s) o 190 nm (200 W, 240 s) dependiendo de la geometría final que queramos alcanzar (ver Figura 6.2, página 180). El grosor fue medido sobre una oblea plana de silicio. A continuación, el grosor de la capa de Au fue reducido mediante un grabado por haz de iones (IBE, de sus siglas en inglés *ion beam etching*) en una atmósfera de argón (rotación del soporte a 10 rpm, ángulo de incidencia 0°). El grabado se mantuvo hasta que se vieron las puntas de las trincheras, en el caso de la capa de Au de 50 nm el proceso de IBE duro 115 s mientras que se necesitaron 530 s en el caso de los 190 nm de Au. Tras este proceso, fue realizado un tratamiento UV/ozono de 5 min seguido de un tratamiento químico para eliminar la capa de Cr de las puntas (20 s). El atacante del Cr es una mezcla ácido perclórico (HClO₄) y hexanitrate de diamonio y cerio (IV), (NH₄)₂[Ce(NO₃)₆]. Por inmersión en BHF (20 s) fue retirada la capa de SiO₂ de las puntas de la trinchera. Posteriormente, el silicio expuesto en las puntas fue atacado con KOH (75%) a 75°C formándose cavidades rómbicas entre las nanoestructuras de Au. Para conseguir nanoestructuras simétricas *sym* el grabado fue de 90 s (excepto en el sustrato *sym2* que fue de 45 s y en *sym1* que no se hizo), y en el caso de las estructuras no-simétricas la inmersión en KOH fue de 135 s.

Mediante inmersión en BHF (20 s) y en el atacante de Cr (20 s) fueron retiradas la capa de 3 nm de SiO₂ y la de 2 nm de Cr de la parte interna de las nanoestructuras de Au, parte expuesta a las cavidades rómbicas creadas en el silicio. Este tratamiento se realizó en todos los sustratos SERS fabricados excepto en *sym4*.

Finalmente, para reducir el espaciado entre nanoestructuras no-simétricas fueron realizados depósitos de Au adicionales durante 5 min para el sustrato *asym2* y 10 min para el sustrato *asym3* a 100 W. La Tabla 6.1 (página 181) resume las dimensiones y características de los sustratos SERS fabricados.

Las medidas del AEF se realizaron con el equipo Alpha 300 de sobremesa y utilizando como molécula patrón R6G. La longitud de onda de excitación fue 633 nm y

el objetivo 50x, una potencia de salida de 3 mW y 1 s de tiempo de integración. En cada muestra se realizaron y promediaron cinco áreas de $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ recogiendo 100 espectros en cada una.

6.2.3 Simulación FDTD

La simulación del campo electromagnético sobre las nanoestructuras de oro simétricas y no simétricas se realizó a través del método FDTD y el software comercial Lumerical (Lumerical Solutions Inc, Ansis). Las dimensiones de las nanoestructuras se determinaron de las imágenes de HR-SEM. Se aplicó un mallado conformacional refinado alrededor de las nanoestructuras a un tamaño de 0,1 nm. Se consideraron condiciones de contorno periódicas en el eje- x y PML en el eje- y . La fuente de luz fue una onda plana que se propaga en dirección- y con el campo eléctrico E paralelo al eje- x de longitud de onda 633 nm, igual que la experimental. Se realizó una prueba de convergencia para determinar la distancia óptima entre la nanoestructura y las condiciones de contorno absorbentes en el eje- y (2,5 μm). En la simulación se utilizaron las curvas de dispersión tabuladas por Palik para el oro, silicio y dióxido de silicio [40], mientras que el índice de refracción del cromo se obtuvo del *CRC Handbook* [421].

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Caracterización de la morfología de las nanoestructuras

La fabricación de estos sustratos SERS la podemos dividir en dos grandes etapas: la primera fue la fabricación nanotrincheras de silicio con puntas afiladas (Figura 6.1), y la segunda, la generación de las nanoestructuras de Au sobre ellas (Figura 6.2).

A su vez la primera etapa, fabricación de las nanotrincheras con puntas afiladas, se divide en tres etapas. Brevemente, en la primera, mediante nanofotolitografía DTL, grabado RIE (Figura 6.1a) y un ataque químico con KOH se fabricó la primera generación de nanotrincheras con una anchura de 172 nm y un espaciado plano entre ellas de 68 nm (Figura 6.1b).

Para generar las puntas entre nanotrincheras se duplicó la periodicidad de estas creando una segunda generación de trincheras en la parte plana. Este proceso se realizó mediante una oxidación local del silicio (LOCOS, Figura 6.1c) seguida de la eliminación

selectiva de la capa de Si_3N_4 (Figura 6.1c) dejando expuesto el silicio entre las trincheras. El silicio fue atacado con TMAH para formar la segunda generación de trincheras (Figura 6.1e), la capa de SiO_2 actuó de máscara dura. Tras este ataque, la anchura de la primera y la segunda generación de trincheras fue de 125 nm y 116 nm, respectivamente, y la profundidad 75 nm y 55 nm.

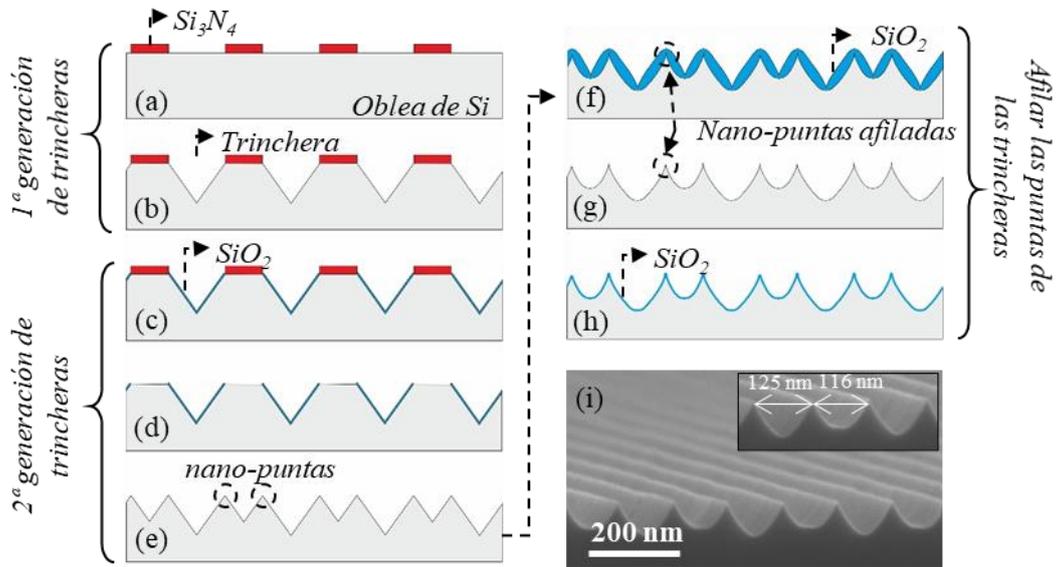


Figura 6.1 Esquema de la fabricación de las nanotrincheras con puntas afiladas: (a) modelado del Si_3N_4 situado sobre el Si-(100) mediante DTL y RIE; (b) formación de la 1ª generación de trincheras mediante ataque con KOH usando como máscara el patrón de Si_3N_4 ; (c) LOCOS; (d) eliminación selectiva de la capa de Si_3N_4 ; (e) formación de la 2ª generación de trincheras mediante un ataque con TMAH usando como máscara la capa de SiO_2 ; (f) oxidación seca de las puntas para afilarlas; (g) eliminación de la capa de SiO_2 y (h) crecimiento de una capa de SiO_2 de 2 nm. (i) Imagen SEM del resultado final.

Por último, las puntas de las nanotrincheras se afilaron para reducir el espaciado entre las futuras nanoestructuras de oro. Para ello, se sometió a la oblea a una oxidación seca (Figura 6.1f) en la que se afilaron las puntas pero también se creó una capa de SiO_2 gruesa que posteriormente fue retirada con HF (Figura 6.1g). Además, para evitar la formación de especies Au-Si se creció una capa fina de SiO_2 de 2 nm (Figura 6.1h). El resultado final de este proceso de fabricación aparece en la Figura 6.1-i. Podemos observar la alta reproducibilidad y homogeneidad de las puntas creadas en la parte superior de las trincheras. Asimismo, todas las técnicas y procesos de fabricación utilizados para obtener estas puntas afiladas son aplicables a escala de oblea, por lo que podríamos fabricar muchos sustratos SERS al mismo tiempo.

La fabricación de las nanoestructuras de oro sobre las nanotrincheras comienza con la deposición por *sputtering* de la capa de Au (Anexo IV-c, pág. 267). Previamente, se depositó una capa de cromo de 3 nm que actúa de adherente de la de Au. De Au se depositaron dos grosores, 50 nm y 190 nm (Figura 6.2a), que más tarde, se redujeron mediante un grabado por haz de iones (IBE) hasta alcanzar las puntas de la trinchera.

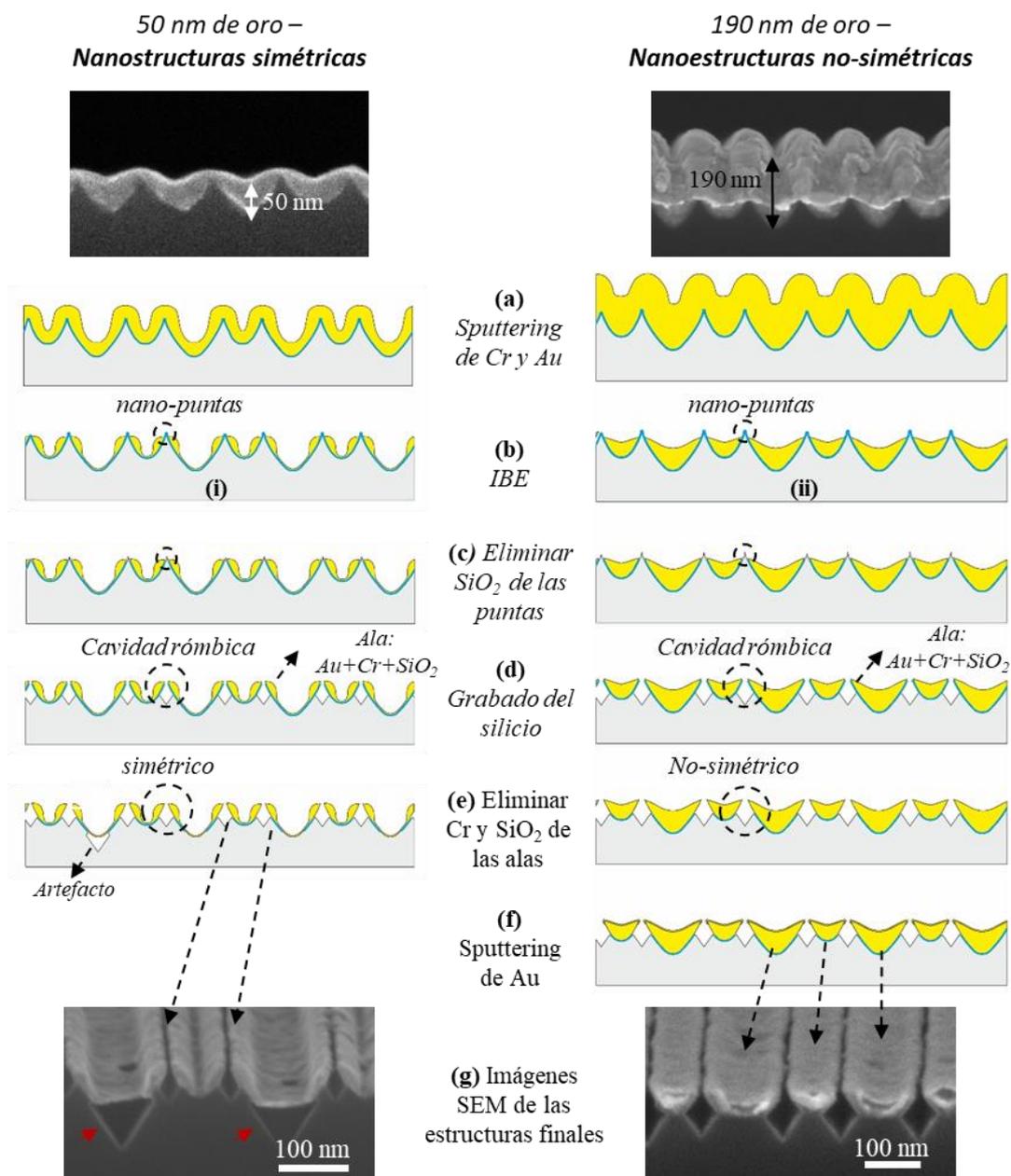


Figura 6.2 E Esquema del *sputtering* de Au sobre las nanotrincheras con puntas afiladas y el posterior postratamiento para conseguir los sustratos SERS: (a) *sputtering* de Cr y Au junto con imágenes SEM de los dos grosores depositados; (b) IBE del Au; (c) eliminación selectiva del SiO₂ de las puntas; (d) formación de las cavidades rómbicas en el silicio mediante el ataque con KOH; (e) eliminación selectiva de las capas de Cr y SiO₂ (f) *sputtering* de Au para reducir el espaciado entre las estructuras de oro. (g) Imagen SEM de las nanoestructuras simétricas y no simétricas. Las flechas rojas señalan los artefactos.

El grosor de la capa de Au en combinación con el tiempo de grabado IBE determinó si la nanoestructura de oro alrededor de la punta era simétrica o asimétrica. El ataque IBE sobre la capa de 50 nm de Au resultó en nanoestructuras de oro con la misma forma a la derecha y a la izquierda de la punta, simétricas (Figura 6.2 b(i)), mientras que el ataque sobre la capa de 190 nm resultó en nanoestructuras de oro de diferente tamaño a cada lado de la nanopunta, no-simétricas (Figura 6.2b (ii)). Tras eliminar la capa de SiO₂ de las puntas (Figura 6.2c), el silicio expuesto se atacó con KOH formándose cavidades rómbicas en la parte superior de la trinchera (Figura 6.2d). El resultado son nanoestructuras de oro en voladizo, alas, sobres las cavidades rómbicas. Estas alas conservan en la parte interior las capas de Cr y SiO₂ que se eliminaron mediante ataques húmedos selectivos (Figura 6.2e). A partir de este paso, realizando pequeñas modificaciones las nanoestructuras simétricas ya estarían terminadas y realizando algún proceso más obtenemos las estructuras no simétricas. Este proceso es el depósito de Au por *sputtering* para reducir el espaciado entre las nanoestructuras de oro (Figura 6.2f). La Figura 6.2g muestra dos ejemplos de estructuras simétricas y no simétricas. La Tabla 6.1 resume las dimensiones y tratamientos realizados a los diferentes sustratos SERS fabricados.

Tabla 6.1 Dimensiones y características de los sustratos SERS estudiados en este capítulo. *Sym* hace referencia a las nanoestructuras simétricas y *asym* a las no-simétricas alrededor de la punta de la trinchera.

Sustrato SERS	Espaciado superior (<i>ES</i>) (nm)	Profundidad de la cavidad rómbica (<i>P</i>) (nm)	Tratamiento adicional
sym1_P-0	6 ± 2	0	capa de SiO ₂ y Cr eliminada
sym2_P-13	6 ± 2	13 ± 1	capa de SiO ₂ y Cr eliminada
sym3_P-40	6 ± 2	40 ± 3	capa de SiO ₂ y Cr eliminada
sym4_P-40*	6 ± 2	40 ± 3	-
asym1_ES-16	16 ± 4	100 ± 5	capa de SiO ₂ y Cr eliminada
asym2_ES-12	12 ± 3	100 ± 5	capa de SiO ₂ y Cr eliminada, <i>sputtering</i> de Au
asym3_ES-8	8 ± 3	100 ± 5	capa de SiO ₂ y Cr eliminada, <i>sputtering</i> de Au

Se prepararon cuatro sustratos SERS basados en nanoestructuras de oro simétricas alrededor de la puntas (Figura 6.3). El espaciado entre nanoestructuras se mantuvo constante en los tres sustratos, 6 ± 2 nm (Figura 6.3a), así como el grosor final de la capa

de Au, 17 ± 3 nm. Estos dos factores son dependientes puesto que se controlan con el grosor inicial de la capa de Au y el posterior ataque IBE. La profundidad (P) se varió entre 0 nm, 13 ± 1 nm y 40 ± 4 nm, muestras *sym1_P-0*, *sym2_P-13* y *sym3_P-40* (Figura 6.3c y d), respectivamente, controlando el tiempo de ataque con KOH. Las dimensiones se calcularon a partir de fotos HR-SEM y con un número de medidas $N > 100$. Además, para estudiar la influencia de la capa de Cr en el aumento de la señal, a la muestra *sym4* no se le retiró (Figura 6.3a). Las cavidades triangulares que se observan bajo la capa de Au son “artefactos” que se formaron durante el ataque con KOH. Debido al proceso de ataque IBE la capa es más fina en la parte plana que sobre las paredes de las nanotrincheras, creándose poros por los que se filtra el KOH que dan lugar a la cavidad triangular.

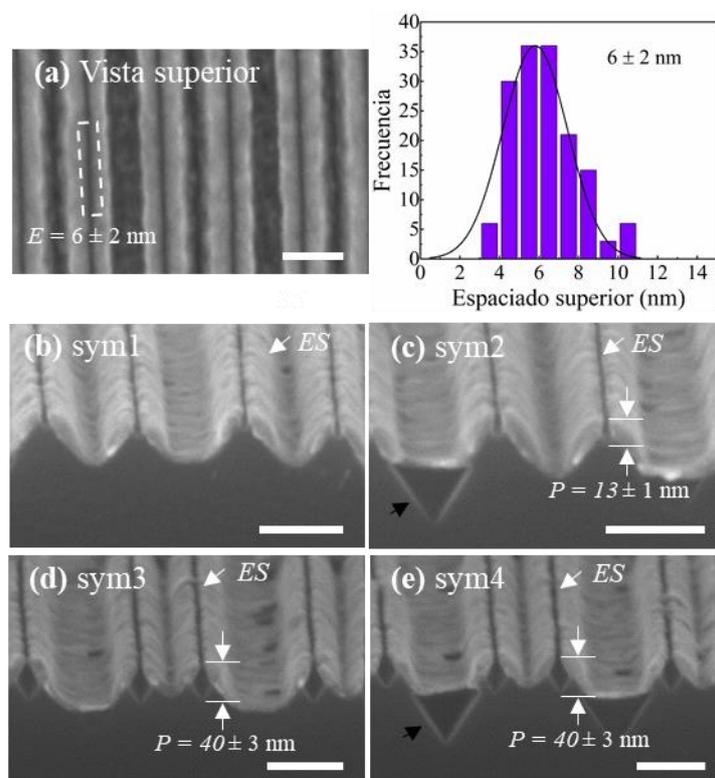


Figura 6.3 Imágenes HR-SEM de las nanoestructuras simétricas alrededor de la punta de la trinchera: (a) vista superior de la muestra *asym1*, junto con el histograma de distribución de tamaños ($N > 150$). Corte transversal de los sustratos (b) *sym1_P-0*; (c) *sym2_P-13*, (d) *sym3_P-40* y (e) *sym4_P-40**. La escala representa 100 nm y la flecha negra artefactos producidos en la grabado con KOH.

La Figura 6.4a-f muestra las imágenes HR-SEM de las nanoestructuras asimétricas a las cuales se les realizó un proceso adicional de *sputtering* de Au para reducir el espaciado de la parte superior. Podemos observar la alta uniformidad del espaciado y de las nanoestructuras en los sustratos SERS preparados. El espaciado fue medido de

diferentes imágenes HR-SEM ($N > 500$) y los resultados aparecen en la Figura 6.4g-i. Al aumentar el número de ciclos *sputterings* de Au el espaciado superior se reduce desde 16 ± 4 nm, a 8 ± 3 nm, *asym1_ES-16* y *asym3_ES-8*, respectivamente. Incluso en algunas puntos de *asym3_ES-8* se forman puentes de Au entre las alas de las nanoestructuras. La longitud de las nanoestructuras de oro son 126 ± 3 nm y 91 ± 3 nm para *asym1_ES-16*, 131 ± 5 nm y 95 ± 3 nm para *asym2_ES-12* y 136 ± 2 nm y 98 ± 3 nm para *asym3_ES-8* (Figura 6.4). La profundidad de la cavidad rómbica fue 100 ± 5 nm en todos los sustratos.

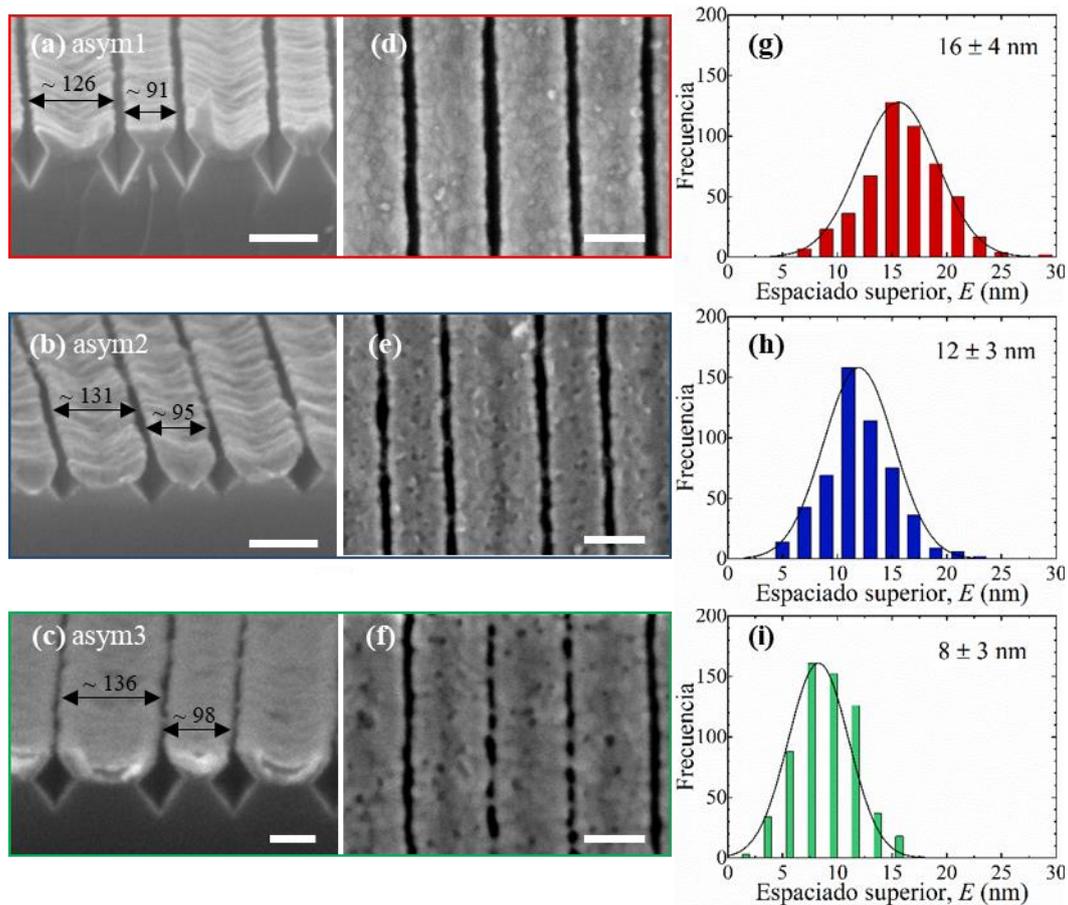


Figura 6.4 Imágenes HR-SEM de las nanoestructuras asimétricas *asym1_ES-16*, *asym2_ES-12* y *asym3_ES-8* vistas en corte transversal (a-c) y desde arriba (d-f) junto con las dimensiones. La escala representa 100 nm. (g-i) Histogramas de la distribución de tamaños del espaciado E entre nanoestructuras de oro obtenido de promediar más de 500 medidas.

Finalmente, para verificar que el postratamiento elimina por completo la capa de Cr del interior de las alas de las nanoestructuras de oro se preparó una lamela del sustrato *asym3_ES-8* y se analizó por STEM y EDX (Figura 6.5). El análisis químico de los elementos nos indica que en la parte interna del voladizo de la nanoestructura de oro no quedan restos de Cr, mientras que sí que aparecen en la interfase con la trinchera. Esto demuestra el buen funcionamiento y nos evita los posibles efectos adversos que podría

provocar la capa de adhesión de Cr en las propiedades ópticas del oro [422]. La eliminación de la capa de SiO₂ también se realizó con éxito, los picos de Si y sobre todo el del oxígeno no aparecen en el área analizada en el voladizo de oro (Figura 6.5c). Por último, las imágenes TEM nos muestran la ausencia de Au en el interior de la cavidad rómbica, es decir, las consecutivos sputtering de Au no consiguen penetrar a esta parte del sustrato.

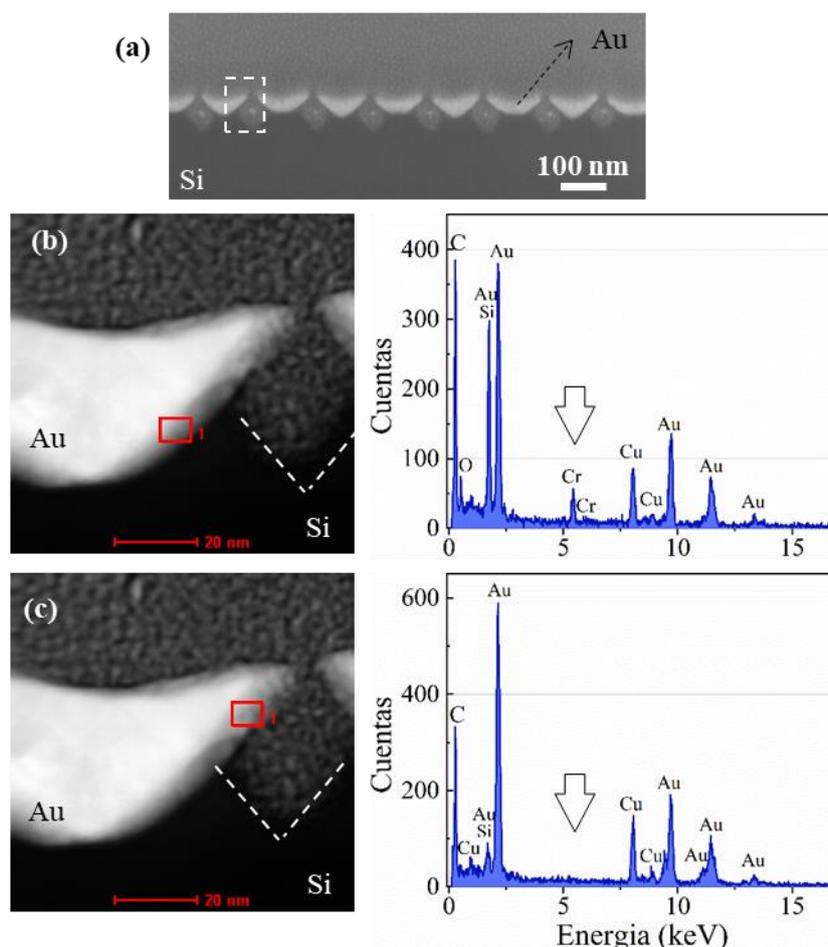


Figura 6.5 Evaluación del postratamiento. (a) Imagen SEM de la lamela del sustrato asym3_ES-8. Imágenes TEM junto con el análisis de composición del área rojo en la interfase con la trinchera (b) y en el voladizo de la nanoestructura de Au expuesto a la cavidad rómbica (c).

En resumen, este proceso de fabricación combinando procesos sencillos y conocidos de nanofabricación, DTL, grabado húmedo del silicio y deposición por *sputtering* de Au, nos ha permitido conseguir sustratos SERS robustos, versátiles y reproducibles a nivel de oblea. Modificando el grosor de la capa de Au depositada podemos obtener estructuras simétricas y no-simétricas controlando el espaciado superior, y, por tanto, los *hot-spots* del sustrato SERS.

6.3.2 Caracterización de las propiedades plasmónicas: simulación FDTD y AEF

6.3.2.1 Nanoestructuras simétricas

Como se ha comentado la amplificación de la señal SERS puede producirse por dos mecanismos: mecanismo electromagnético, EM, y mecanismo químico de transferencia de carga, TC (ver apartado 1.3.2, pág. 17). Para conocer la naturaleza y origen del aumento de la señal en las nanoestructuras de oro alrededor del espaciado superior se realizó un estudio teórico de la distribución del campo eléctrico sobre estas usando el método FDTD.

La amplificación SERS debida al EM depende de las dimensiones de las nanoestructuras plasmónicas [35], por eso, en primer lugar, se estudió la dependencia del espaciado superior ES con la profundidad P de la cavidad rómbica creada a través de la punta de las trincheras. Para ello se simuló una nanoestructura simétrica alrededor del espaciado superior en la que se fue variando el tamaño del espaciado entre 2-16 nm en función de la profundidad de la cavidad rómbica, P entre 0 y 100 nm (Figura 6.6a). El grosor de la nanoestructura de Au se mantuvo constante en 17 nm. El área promedio para calcular el aumento del campo eléctrico (“recuadro negro” de la amplificación de la Figura 6.6b) se modificó con el tamaño del ES : en cada simulación la distancia en el eje- y es constante, 4 nm, y en el eje- x tiene la longitud del ES .

A modo de ejemplo, en la Figura 6.6b podemos observar el resultado de la simulación FDTD en la nanoestructura simétrica con un ES de 2 nm y P 16 nm. La escala de color representa la amplitud normalizada del campo eléctrico generado $|E|$ respecto a la amplitud del campo eléctrico incidente $|E_0|$. En esta estructura se observa que el principal origen del efecto SERS proviene del espaciado entre las dos alas de oro de la nanoestructura. La Figura 6.6c muestra el campo eléctrico promedio obtenido en el espaciado entre nanoestructuras de oro (área enmarcada por la caja negra en la amplificación de la Figura 6.6b) en función de P para los 6 valores de ES estudiado.

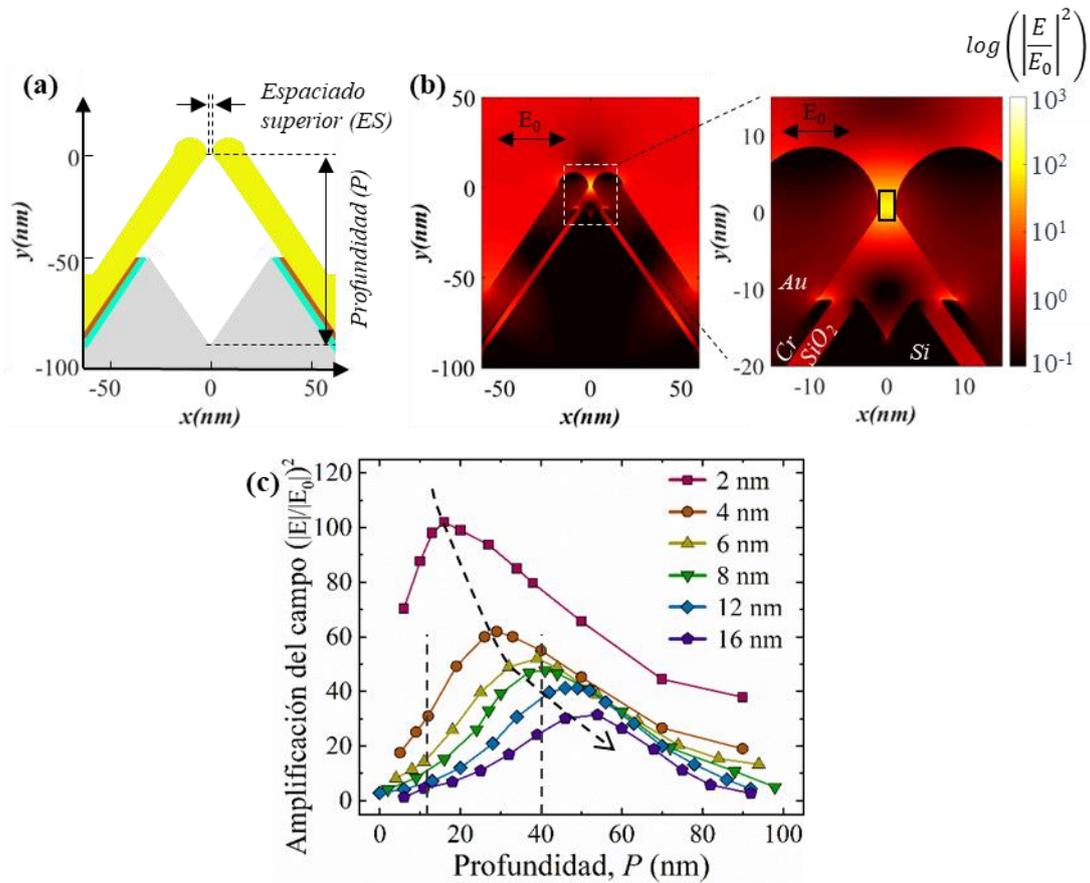


Figura 6.6 (a) Esquema del corte transversal de la estructura simétrica alrededor del espacio superior simulada con el método FDTD. Código de color: gris, Si; azul, SiO₂; naranja, Cr; amarillo, oro. (b) Distribución de la intensidad del campo eléctrico a la longitud de onda de excitación de 633 nm sobre una nanoestructura simétrica con un *ES* de 2 nm y *P* 16 nm. (c) Promedio de la amplificación del campo eléctrico FDTD generada en el espaciado entre nanoestructuras, caja negra de (b). La flecha señala la tendencia del campo eléctrico en función del *ES* y *P*. Las líneas punteadas verticales señalan la profundidad de las estructuras *sym* fabricadas.

Los resultados de la Figura 6.6c nos indican que la amplificación del campo eléctrico $(E/E_0)^2$ sigue la misma tendencia para todos los *ES* estudiados. El $(E/E_0)^2$ aumenta hasta alcanzar un máximo a una cierta *P* para luego comenzar a descender, señalando la dependencia entre *P* y *ES*. La máxima amplificación se obtuvo para los menores *ES*, es decir, 2 nm, 4 nm y 6 nm, donde el acoplamiento del plasmón de las nanoestructuras de Au de ambos lados del espaciado es más fuerte [35,274]. Asimismo, al aumentar el *ES* se reduce la intensidad del máximo de $(E/E_0)^2$ por la disminución del acoplamiento entre plasmones, además de desplazarse a mayores valores de *P*. Este fenómeno puede explicarse por la absorción de la luz en el silicio. Cuando la amplificación del campo eléctrico se origina cerca de un material semiconductor como el silicio, este puede absorberlo debido a un acoplamiento en el campo cercano (*near-field coupling*) para

generar electrones y huecos [423–425], este efecto podríamos denominarlo *quenching* del *hot spot* y es el mecanismo de algunas celdas solares [426,427]. Por lo tanto, los *hot-spots* generados en *ES* mayores requieren que la cavidad rómbica sea más profunda para evitar que la amplificación sea “quencheada” por el silicio. Los mayores $(E/E_0)^2$ se alcanzaron para *P* comprendidas entre 20 y 60 nm.

Tras este estudio preliminar se pasó a evaluar las estructuras simétricas fabricadas. En primer lugar, se verificó la dependencia de la intensidad con la profundidad de la cavidad rómbica. La Figura 6.7a muestra el espectro SERS promedio ($N = 300$) de la R6G recogido sobre los *sym1_P-0*, *sym2_P-13* y *sym3_P-40*. La Figura 6.7b muestra el resultado de una de las áreas recogidas en cada sustrato. Podemos observar que la señal SERS es dependiente de la profundidad de la cavidad rómbica de silicio. Al igual que indican las simulaciones FDTD de estas estructuras (Figura 6.8), la intensidad SERS aumenta al aumentar la profundidad de la cavidad rómbica. La RSD de la intensidad fue 9%, 38% y 11% para los sustratos *sym1_P-0*, *sym2_P-13* y *sym3_P-40*, respectivamente. La alta RSD de la muestra *sym2_P-13* puede estar debida a un error accidental en la manipulación de la muestra.

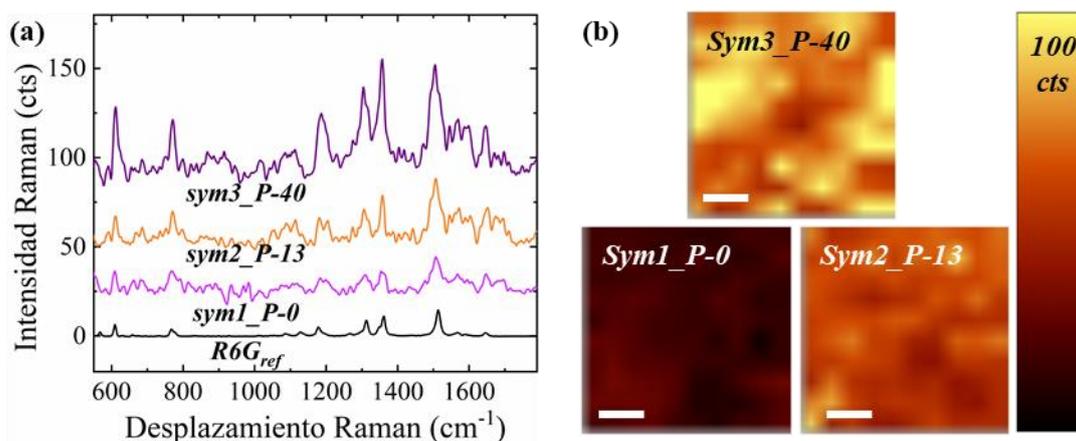


Figura 6.7 (a) Espectro SERS promedio de la R6G 1 μM recogido sobre los sustratos con nanoestructuras de oro simétricas *sym1_P-0*, *sym2_P-13* y *sym3_P-40* comparados con el espectro de la R6G pura. Los espectros están desplazados en el eje-y. (b) Mapas de intensidad SERS monitorizando el pico desplazado a 1510 cm^{-1} de la R6G recogidos sobre los mismos sustratos SERS que en (a). La escala representa $10\ \mu\text{m}$.

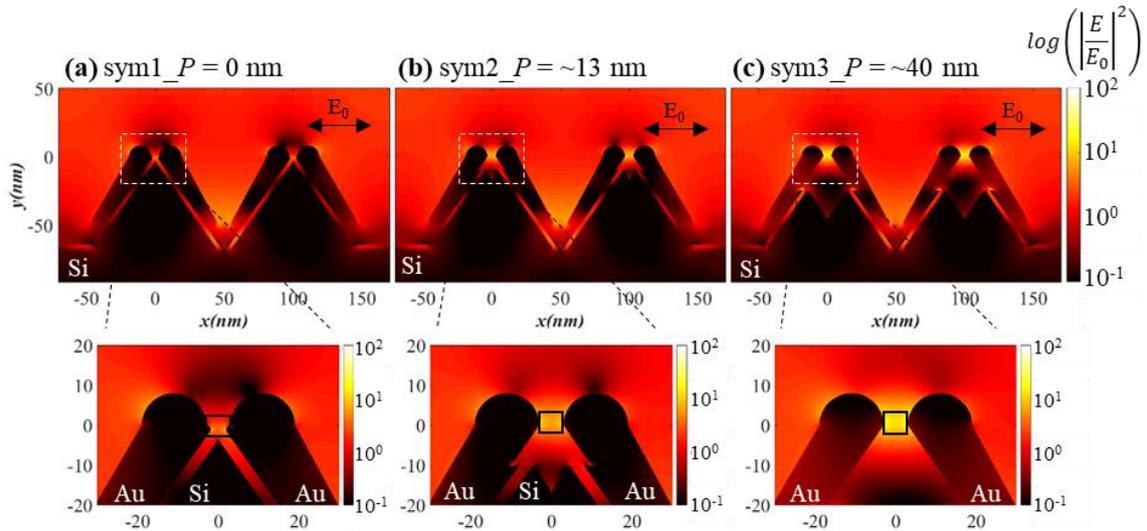


Figura 6.8 Distribución de la intensidad del campo eléctrico a la longitud de onda de excitación de 633 nm sobre las nanoestructuras simétricas: **(a)** sym1_P-0, **(b)** sym2_P-13 y **(c)** sym3_P-40. La caja negra representa el área promediada para calcular la amplificación del campo sobre estas estructuras.

El AEF se calculó utilizando las intensidades promedio de la R6G y el resultado fue $5,5 \times 10^4$, $9,4 \times 10^4$ y $1,8 \times 10^5$ para sym1, sym2 y sym3, respectivamente. Para poder comparar este resultado con las simulaciones FDTD (Figura 6.8) tenemos que considerar que el factor de aumento SERS electromagnético se describe siguiendo la Ecuación 6.1:

$$EF \propto \left(\left| \frac{E}{E_0} \right| \right)^4 \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Donde $|E|$ es la amplitud del campo eléctrico generado en el espaciado entre nanoestructuras (promedio del área enmarcada por la caja negra de la Figura 6.8) y $|E_0|$ es la amplitud de la onda electromagnética de excitación que es 1.

En la Figura 6.9a podemos observar que el AEF experimental es alrededor de 10^2 - 10^3 veces superior al obtenido mediante las simulaciones FDTD, sin embargo, ambos siguen la misma tendencia lo cual demuestra la validez de las simulaciones FDTD. Estas diferencias entre el AEF experimental y EF teórico han sido reportadas en literatura para otro tipo de estructuras, especialmente, pilares de silicio recubiertos de diferentes metales [210,428,429]. El origen de esta discrepancia puede estar en lo que se ha considerado como “hot-spot”. En la simulación FDTD hemos promediado sólo el aumento de la señal producido en la región entre las dos nanoestructuras de oro, en cambio en el cálculo experimental del AEF la señal recogida procede de toda la nanoestructura, es decir, de las

moléculas situadas en el espaciado entre nanoestructuras y sobre las propias nanoestructuras. Otro posible origen es que en la simulación FDTD no se ha tenido en cuenta la contribución del mecanismo de transferencia de carga TC al efecto SERS y la TC puede contribuir a la amplificación total en un factor de hasta 10^2 .

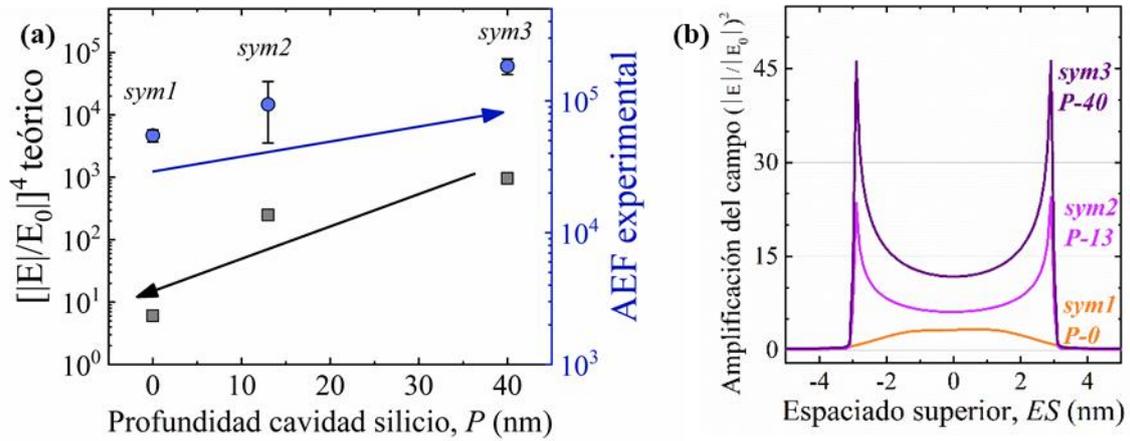


Figura 6.9 (a) Efecto de la profundidad de la cavidad rómbica de silicio P en la amplificación de la señal calculada teórica (negro) y experimentalmente (azul). Las barras de error representan la desviación estándar. (b) Simulación FDTD de la amplificación del campo eléctrico a lo largo del espaciado superior ES en los sustratos: sym1_P-0, sym2_P-13 y sym3_P-40.

La simetría alrededor del espaciado superior queda demostrada si observamos la distribución de la amplificación del campo eléctrico a lo largo de este (Figura 6.9b). Podemos observar que para los sustratos sym2_P-13 y sym3_P-40 la amplificación describe una curva simétrica con un máximo situado junto a las nanoestructuras de oro y un mínimo situado en el centro del espaciado. La amplificación en este valle no llega a caer a cero debido al acoplamiento de los plasmones generados sobre las nanoestructuras de ambos lados del espaciado [274]. El sustrato sym1 tiene silicio en el espaciado, $P = 0$ nm, y se describe una forma diferente.

Si comparamos el sustrato al que se le ha retirado la capa de Cr del interior de la cavidad rómbica silicio, sym3_P-40, con el que la mantiene, sym4_P-40*, para una P fija, la señal teórica y experimental aumenta en ausencia de esta (Figura 6.10). Como ocurría con la presencia de silicio, la presencia de Cr provoca una reducción de la intensidad debido a la absorción del plasmón en el Cr. Resultados similares se han reportado para pilares de silicio recubiertos con plata una vez se les retira la capa de Cr [429].

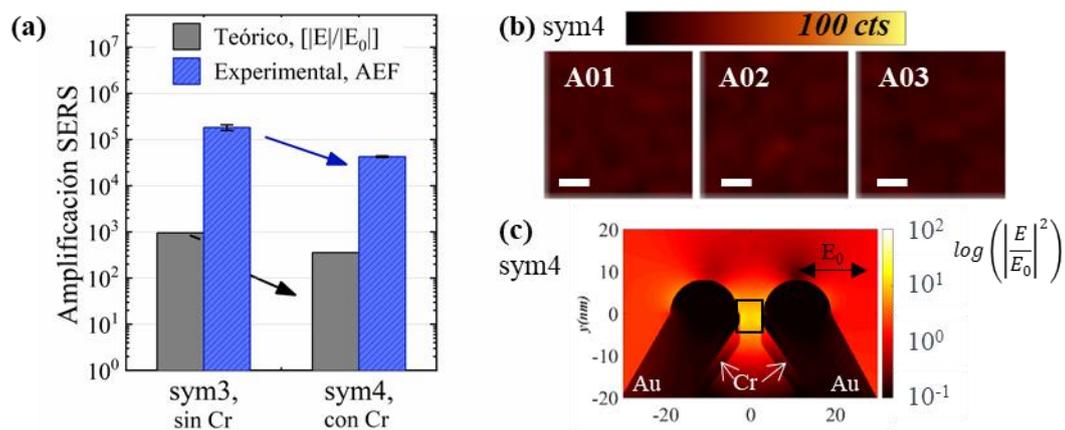


Figura 6.10 Evaluación del proceso de eliminación de la capa de Cr. **(a)** Resultado teórico y experimental de la amplificación de la señal SERS en nanoestructuras sin eliminar la capa de Cr (sym4_P-40*) y eliminándola (sym3_P-40). **(b)** Mapas de intensidad monitorizando el pico a 1510 cm^{-1} de la R6G $1\mu\text{M}$ recogidos sobre sym4. La escala representa $10\text{ }\mu\text{m}$. **(c)** Simulación FDTD de la distribución del campo eléctrico sobre el espaciado entre nanoestructuras de oro en la muestra sym4_P-40*.

6.3.2.2 Nanoestructuras asimétricas

Por otro lado, investigamos la influencia que ejerce tener nanoestructuras asimétricas alrededor del espaciado superior en la respuesta SERS (Tabla 6.1 y Figura 6.4). En estas estructuras estudiamos la dependencia del efecto SERS variando el tamaño del espaciado, ES entre 16 y 8 nm, a una profundidad de la cavidad de silicio fija ($P \sim 100\text{ nm}$).

La distribución del campo eléctrico sobre las nanoestructuras asimétricas con espaciados entre 16 y 8 nm aparece en la Figura 6.11a-c. Podemos observar que la intensidad del campo eléctrico generado aumenta al reducir el tamaño del espaciado superior debido al acoplamiento del plasmón de resonancia de superficie [274,428]. Este acoplamiento es claramente observable si graficamos la amplificación del campo eléctrico en función de la longitud del espaciado (Figura 6.11d). Además, también observamos que el campo eléctrico es asimétrico a lo largo del espaciado, haciéndose máximo sobre la nanoestructura de oro de mayor tamaño. En contraste con las nanoestructuras simétricas donde en todos los casos la distribución del campo eléctrico en el espaciado también era simétrica (Figura 6.9b, pág. 189).

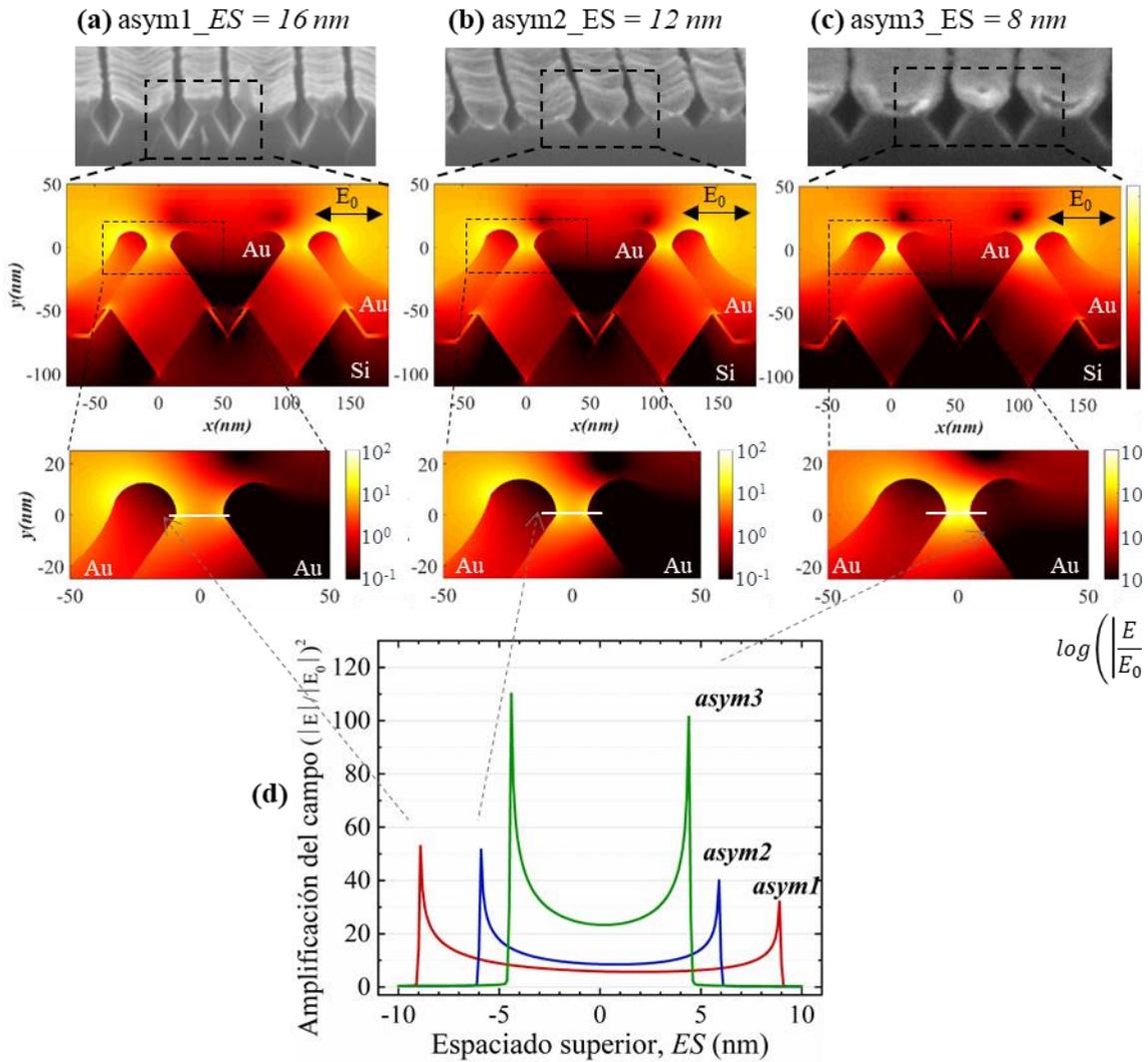


Figura 6.11 Distribución de la intensidad del campo eléctrico a la longitud de onda de excitación de 633 nm sobre las nanoestructuras no-simétricas: **(a)** *asym1*_ES-16, **(b)** *asym2*_ES-12 y **(c)** *asym3*_ES-8. **(d)** Simulación FDTD de la amplificación del campo eléctrico a lo largo del espaciado superior ES , línea blanca, en los sustratos *asym1*, *asym2* y *asym3*. Las flechas indican cual es cada vértice. Las cajas sobre las imágenes SEM señalan la celda unidad simulada.

En este caso las nanoestructuras de oro de mayor tamaño están actuando como una antena óptica [430,431]. Una nano-antena o resonador óptico se define como aquel dispositivo capaz de transformar la radiación óptica en una energía localizada, absorbiendo el campo eléctrico incidente y confinándolo en sus extremos [204]. Para corroborar esta hipótesis realizamos medidas dependientes de la polarización del campo incidente, es decir, medidas con el campo eléctrico paralelo ($E_{0,p}$) y perpendicular ($E_{0,s}$) a las nanoestructuras de oro (Figura 6.12a). Como puede observarse, la señal Raman de las dos polarizaciones difiere en un factor de 5 en *asym1*_ES-16 y de 10 *asym2*_ES-12. En literatura está reportado que el aumento de la señal Raman es mayor cuando el campo

eléctrico incidente está alineado con la dirección de la nano-antena [430]. Por lo tanto, esta diferencia de intensidad según la polarización de la luz demuestra que las nanoestructuras de oro más grandes actúan como nano-antenas en nuestros sustratos SERS. Este efecto es especialmente importante en los sustratos con espaciados de 16 nm y 12 nm, *asym1* y *asym2*, respectivamente, donde es el principal origen de la amplificación de la señal. Sin embargo, en el caso del espaciado de 8 nm, *asym3*, la amplificación del campo es el sumatorio de dos efectos: el efecto antena y el acoplamiento de los plasmones adyacentes en el espaciado superior.

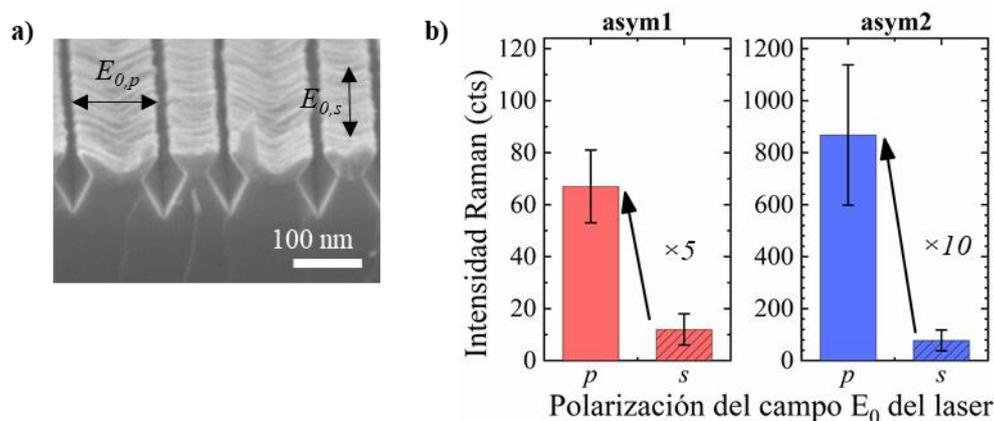


Figura 6.12 (a) Esquema indicando la dirección de la polarización *p* y *s* sobre las nanoestructuras de oro. (b) Intensidad promedio del pico a 1510 cm^{-1} de la R6G $1\text{ }\mu\text{M}$ recogida sobre los sustratos *asym1* y *asym2* con el campo eléctrico polarizado en *p* y *s* con la dirección de la nanoestructura de oro.

La actividad SERS de estas muestras fue analizada calculado el AEF, ver apartado 2.2 (pág. 50). Ejemplos de las áreas recogidas junto con el espectro promedio de la R6G en cada sustrato aparecen en la Figura 6.13. Como podemos observar al reducir el tamaño el espaciado superior la intensidad de la señal SERS aumenta, alcanzándose la máxima amplificación para el sustrato con menor espaciado, *asym3_ES-8*, de entre los estudiados. La desviación estándar de los sustratos fue de 21%, 30% y 30% para los sustratos *asym1_ES-16*, *asym2_ES-12* y *asym3_ES-8*, respectivamente. La relativamente baja uniformidad de la actividad SERS puede atribuirse a variaciones del tamaño del espaciado. Para un espaciado promedio de $8 \pm 3\text{ nm}$, variaciones de 1 nm pueden cambiar la intensidad SERS en ordenes de magnitud debido a que la amplitud del campo eléctrico generado tiene una dependencia inversa con el tamaño del gap [35].

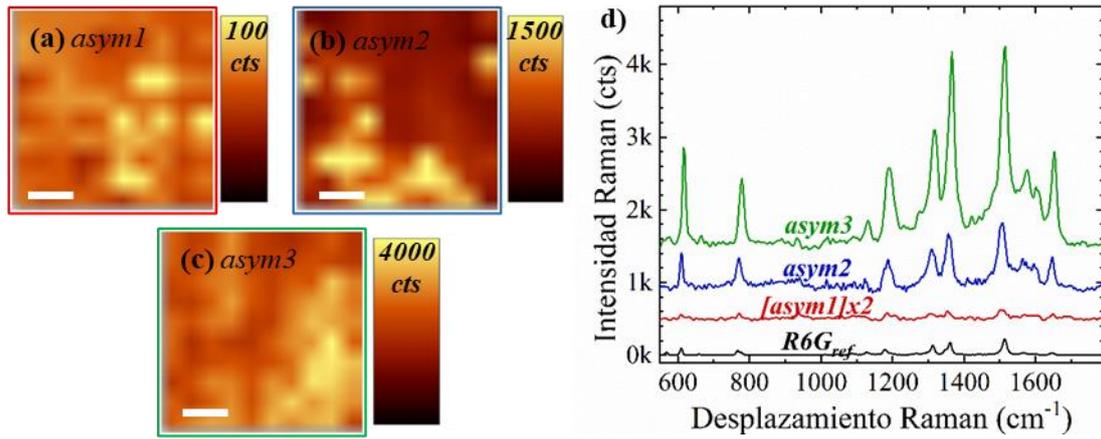


Figura 6.13 Mapas de intensidad SERS monitorizando el pico a 1510 cm⁻¹ de la R6G 1 μM recogidos sobre los sustratos con nanoestructuras asimétricas: (a) *asym1*_ES-16 nm; (b) *asym2*_ES-12 nm y (c) *asym3*_ES-8 nm. La escala representa 10 μm. (d) Espectro SERS de la R6G promediando más de 500 espectros recogidos en los sustratos asimétricos (a-c) comparado con el espectro de la R6G pura. Los espectros están desplazados en el eje-y.

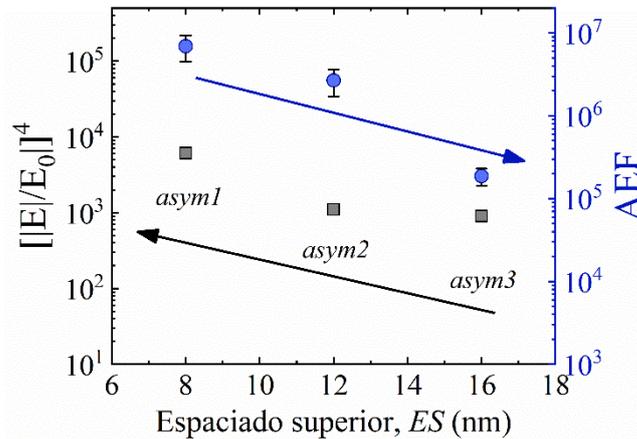


Figura 6.14 Efecto del espaciado superior *ES* en la amplificación de la señal calculada teórica (negro) y experimentalmente (azul) sobre las nanoestructuras asimétricas. Profundidad = 10 nm. Las barras de error representan la desviación estándar.

A través de la Ecuación 2.4 (pág. 50), el AEF experimental fue calculado en $1,9 \times 10^5$, $2,7 \times 10^6$ y $6,9 \times 10^6$ para *asym1*_ES-16, *asym2*_ES-12 y *asym3*_ES-8, respectivamente (Figura 6.14). Estos AEF son mayores a los obtenidos por las estructuras simétricas a pesar de tener, en todos los caso, un mayor espaciado entre las nanoestructuras de oro (Tabla 6.1). Por su parte, el factor de aumento teórico fue calculado utilizando la Ecuación 6.1 y los resultados también se muestran en la Figura 6.14. En general las nanoestructuras de oro asimétricas han reportado mayores aumentos de señal que las simétricas debido al efecto antena que se produce sobre las nanoestructuras de oro de mayor tamaño y el acoplamiento de los plasmones adyacentes.

6.4 CONCLUSIONES

En este capítulo se han desarrollado sustratos SERS basados en nanoestructuras de oro sobre trincheras de silicio. Las trincheras de oro se fabricaron mediante combinación de *Displacement Talbot Lithography* (DTL), *corner lithography* y un ataque selectivo y anisotrópico del silicio. A continuación, las nanoestructuras de oro fueron formadas sobre las nanotrincheras mediante un grabado por haz de iones (IBE) de la capa de oro depositada por *sputtering*. El grosor de la capa de oro en combinación con el tiempo de ataque IBE determinaron la simetría de la nanoestructura de oro alrededor de la trinchera. Por su parte, el espacio entre las nanoestructuras de oro asimétrico fue modificado mediante sucesivas evaporaciones de oro. Este novedoso protocolo de fabricación ha permitido conseguir sustratos SERS robustos y uniformes a escala de oblea con simetrías variables y *hot-spots* de entre 6-16 nm modificando un solo paso: el grosor de la capa de Au depositada.

La actividad SERS de las nanoestructuras de oro simétricas y no-simétricas alrededor del espaciado superior fue analizada experimentalmente calculando el AEF y teóricamente usando simulaciones FDTD. En ambas estructuras se ha observado que al disminuir el tamaño del espaciado superior, aumenta la intensidad del campo eléctrico, debido al acoplamiento de los plasmones de nanoestructuras adyacentes en el espaciado superior. En el caso de las nanoestructuras simétricas se ha demostrado que este es el principal origen del aumento de la señal, y que para aumentar el campo eléctrico sobre espaciados grandes se requieren mayores profundidades de la cavidad de silicio. Por su parte, las nanoestructuras no-simétricas de mayor tamaño se comportan como una antena óptica amplificando la señal. En este caso, el aumento de la señal Raman depende de la polarización de la luz con respecto a la dirección de la anchura de las nanoestructuras de oro. Las nanoestructuras de oro asimétricas con un espaciado superior de ~8 nm combinan el efecto antena con el acoplamiento de los plasmones adyacentes alcanzando un AEF de 6.9×10^6 .

Finalmente, la correlación entre los resultados experimentales determinados mediante el AEF y las simulaciones FDTD demuestran la concordancia entre las aproximaciones teóricas y los resultados experimentales, que predicen de manera adecuada las tendencias observadas experimentalmente.

Capítulo VII

MICROESTRUCTURAS 3D PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN FASE GAS Y LIQUIDA

Resumen

En este capítulo se han fabricado sustratos SERS basados en microestructuras 3D ordenadas para su aplicación en la detección de compuestos organofosforados. En la primera parte se describe el proceso completo de fabricación de las microestructuras: G0, G1 y G3. En la segunda, se estudiaron las micropirámides G0 y G1 evaporadas con una capa fina de plata. La microestructura G1 fue capaz de detectar 10^{-18} M de paraoxon debido a la extraordinaria amplificación originada por los Edge Plasmon Polaritons (EPPs) en sus aristas y los breathing modes generados sobre sus caras laterales. En la tercera parte, se utilizaron las microestructuras G1 y G3 recubiertas de una capa metálica de Ag y nanopartículas de oro. Se estudió la amplificación de la señal originada por los EPPs acoplados a la interacción partícula-partícula y partícula-capas metálicas. Y, finalmente, se aplicaron a la detección de agentes nerviosos en fase gas.

7 MICROESTRUCTURAS 3D PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN FASE GAS Y LIQUIDA

7.1 INTRODUCCIÓN

Además de en los espaciado entre nanopartículas o nanoestructuras, la amplificación de la señal SERS también puede producirse en superficies planas metálicas [38,39]. Los plasmones superficiales (SP) son las ondas electromagnéticas que se propagan a lo largo de la interfase metal-dieléctrico. Sin embargo, como los electrones al moverse disipan energía en forma de calor, los SPP tienen un corto alcance, hasta 200 nm [39]. Para poder excitar estos modos plasmónicos de una manera eficiente las dimensiones xy de la capa metálica deben estar próximas a la longitud de onda del láser.

En literatura se han reportado algunos ejemplos de sustratos SERS micrométricos capaces de soportar modos plasmónicos [207,335,432]. Entre ellos, las estructuras fractales de Sierpinski con tamaños entre 150 nm y 4 μm y sobre las que depositan una capa de plata de 40 nm [433]. Aunque la mayor amplificación del campo fue observada sobre las estructuras con tamaños entre 150-750 nm, también se observó que las estructuras de 1,2 μm producían una amplificación de la señal 100 veces superiores a la originada por la superficie metálica plana.

En este capítulo hemos desarrollado sustratos SERS basados en microestructuras piramidales ordenadas y fractales mediante un procedimiento *top-down* a las que se les ha evaporado una capa de plata. El desarrollo de esta metodología nos ha permitido obtener sustratos SERS homogéneos y robustos a escala de oblea donde la microestructura metálica es capaz de soportar diferentes modos SPP. Además, las estructuras micrométricas son más fácilmente manipulables que las nanométricas. Estos sustratos han sido caracterizados y aplicados a la detección de pesticidas en fase líquida.

Otra aplicación interesante de los modos plasmónicos superficiales es su interacción con las nanopartículas metálicas [168,313,315–318,434–436], lo cual produce un mayor aumento de la señal SERS. Esta interacción se ha aprovechado para detectar agentes neurotóxicos en fase gas.

7.2 FABRICACIÓN DE MICROESTRUCTURAS SERS

7.2.1 Fabricación de microestructuras 3D periódicas tipo fractal

Los sustratos utilizados en este capítulo fueron fabricados por el Ing. Erwin J. Berenschot, en el Instituto MESA+ de la Universidad de Twente (Países Bajos), en el marco de una colaboración con el grupo *Mesoscale Chemical Systems* (MCs), de la misma universidad con el Dr. Roald Tiggelaar y el Dr. Niels R. Tas.

Las microestructuras fractales 3D se fabricaron mediante combinación de un proceso de grabado anisotrópico del silicio y una litografía selectiva a los vértices o *corner lithography* [437]. Brevemente, sobre una oblea de silicio con SiO₂ térmicamente crecido se realiza una litografía óptica con una máscara con motivos de 5 μm de diámetro y una periodicidad de 25 μm. La capa de SiO₂ se retira con una disolución tampon de ácido fluorhídrico (BHF). Posteriormente, el silicio expuesto es grabado anisotrópicamente utilizando hidróxido de potasio (KOH) y de este modo se crea una pirámide invertida en los motivos de 5 μm. A continuación, la oblea de silicio fue uniformemente recubierta con una capa de 160 nm de nitruro de silicio enriquecido en silicio (SiRN). En este punto finaliza la fabricación de la **generación cero G0 de micropirámides** (Figura 7.1a).

La fabricación de las siguientes generaciones continua con el proceso de *corner lithography* que se refiere a un grabado isotrópico del SiRN (Figura 7.1b) utilizando ácido fosfórico (H₃PO₄) hasta que solo queda SiRN en el vértice inferior de la pirámide (Figura 7.1c). La siguiente etapa es una oxidación local del silicio (LOCOS, de sus siglas en inglés *LOCal Oxidation of Silicon*), durante la cual el silicio expuesto en las paredes de la pirámide es oxidado a SiO₂ de manera local utilizando como máscara el SiRN del vértice. Tras esto, el SiRN del vértice fue retirado con H₃PO₄. A continuación, se ataca el silicio anisotrópicamente con hidróxido de tetrametil amonio (TMAH) que pasa a través del vértice expuesto y que permite que se formen las formas octaédricas en la punta de la pirámide invertida (Figura 7.1d). Después de retirar la capa de SiO₂ y crecer 160 nm de SiRN la **primera generación G1 de micropirámides** está terminada. Para conseguir la segunda generación, G2 (Figura 7.1f), y la **tercera generación G3 de microestructuras fractales piramidales** (Figura 7.1h) se tiene que repetir el proceso completo.

Finalmente, cada una de las generaciones de microestructuras piramidales de SiRN se unen mediante *anodic bonding* a una oblea de pyrex de 500 μm , y a continuación, la oblea de silicio originaria se disuelve en KOH dejando expuestas las microestructuras.

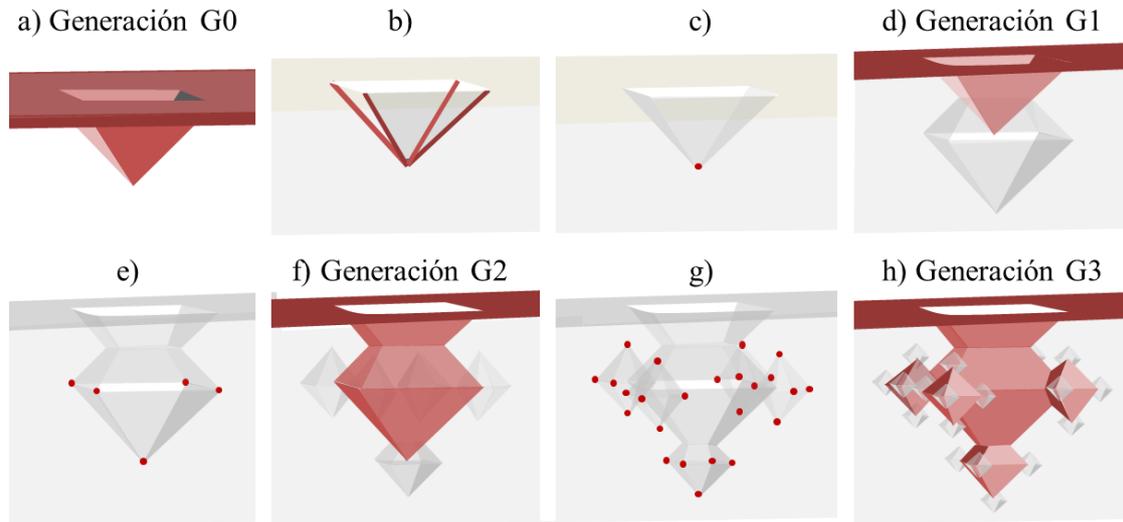


Figura 7.1 Esquema de fabricación de las microestructuras fractales 3D basadas en pirámides invertidas y microestructuras octaédricas: evolución desde la generación G0 (a) hasta la generación G1 (d), la generación G2 (f) y la generación G3 (h).

7.2.2 Evaporación de capas finas de plata

Para poder tener plasmones propagantes necesitamos una capa metálica continua sobre el sustrato. Por eso, se realizó un estudio preliminar del espesor mínimo de Ag que nos permitiría conseguir esta capa continua. El estudio se realizó sobre sustratos planos de SiO_2/Si puesto que las microestructuras no pueden medirse en el AFM. Se seleccionaron los tiempos de evaporación por haz de electrones de 90 s, 300 s y 850 s, obteniéndose unos espesores de capa medidos por AFM de 12 ± 1 nm, 77 ± 3 nm y 195 ± 5 nm, respectivamente. Para más información sobre la técnica ver Anexo IV-d, pág. 268. La Figura 7.2 nos muestra imágenes SEM y AFM de estas evaporaciones donde podemos observar que al aumentar el tiempo de evaporación se pasa desde islas de Ag para un tiempo de 90 s a una capa continua en 300 y 850 s. Por el contrario, la rugosidad media de la capa decrece conforme aumentamos el tiempo de evaporación (Tabla 7.1). Se midió el ángulo de contacto para verificar que la mojabilidad de los sustratos es adecuada para llevar a cabo los protocolos siguientes de mojado en la disolución del analito o bien para incubar las AuNP@citrato. Importante recordar que cuando el ángulo de contacto es menor de 90° el líquido moja la superficie [438]. En nuestro caso, al

comenzar a evaporar la plata el ángulo de mojado aumenta hasta 113° para luego descender hasta 90° para los tiempos de evaporación superiores (Tabla 7.1). A raíz de estos resultados, se seleccionaron tiempos de evaporación de 160 s y 300 s que dieron lugar a un espesor de alrededor de 40 nm y 77 nm, respectivamente.

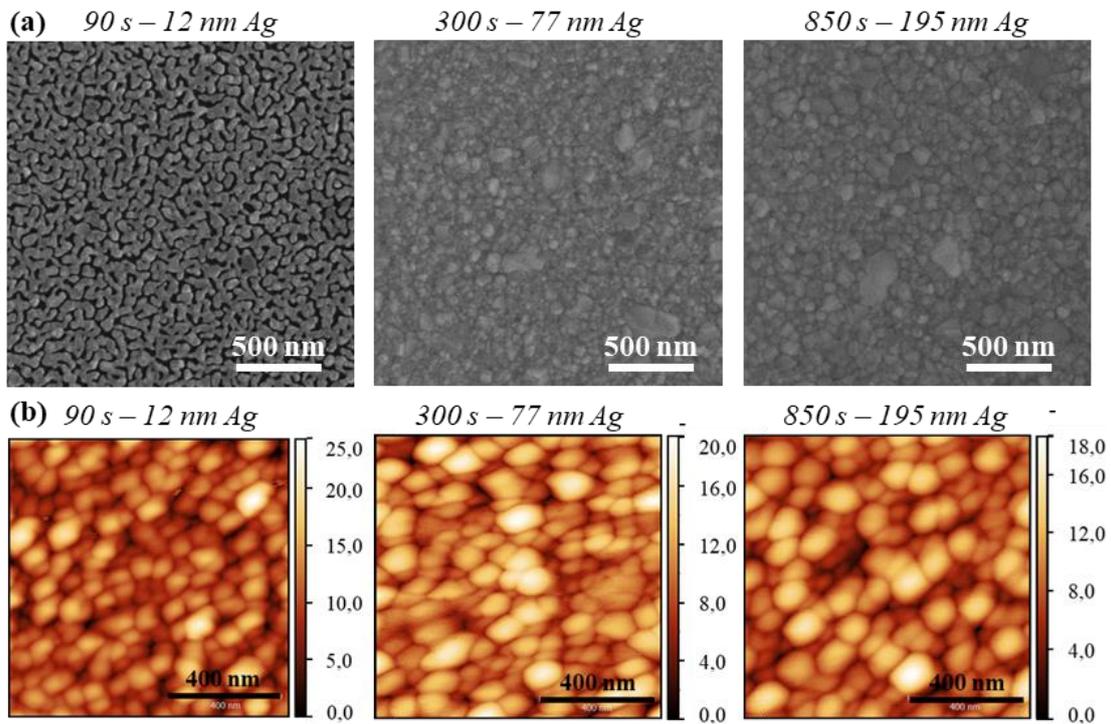


Figura 7.2 Caracterización SEM (a) y AFM (d) de las capas de plata de grosor 12 nm y 77 nm y 195 nm evaporadas sobre una oblea de SiO_2/Si .

Tabla 7.1 Espesor, rugosidad y ángulo de contacto de las capas de plata evaporadas sobre SiO_2/Si .

Tiempo evaporación	Espesor (nm)	Rugosidad promedio (nm)	Ángulo de Mojado ($^\circ$)
0	-	-	53 ± 4
90 s	12 ± 1	$2,8 \pm 0,1$	113 ± 2
300 s	77 ± 3	$2,6 \pm 0,2$	90 ± 4
850 s	195 ± 5	$2,0 \pm 0,1$	94 ± 1

7.3 MICROPIRÁMIDES G0 Y G1 RECUBIERTAS DE PLATA PARA LA DETECCIÓN DE PESTICIDAS EN FASE LÍQUIDA¹¹

7.3.1 Procedimiento experimental

7.3.1.1 Materiales

El 4-nitrofenol (4-NBT) y el paraoxon-metil fueron comprados en Sigma-Aldrich. Los pellets de plata (99,999 %) utilizados en la preparación de capas finas sobre las micropirámides se adquirieron en Kurt J. Lesker Company. Las obleas de pyrex Mempax® de 500 μm .

7.3.1.2 Preparación de los sustratos SERS

Las obleas con las microestructuras G0 y G1 fabricadas en la Universidad de Twente, según el protocolo descrito en el apartado 7.2.1 (pág. 198), se cortaron en piezas de 4 mm \times 5 mm (0,2 cm²) y se evaporó sobre ellas una capa fina de plata de 40 nm mediante evaporación por haz de electrones, 160 s de evaporación. Como referencia se utilizó una oblea de pyrex sin microestructuras, en adelante pyrex, sobre la que se evaporó la misma cantidad de plata, 40 nm.

Las medidas del AEF y de detección de paraoxon se realizaron con el equipo Alpha 300 de sobremesa, la longitud de onda de excitación de 785 nm y el objetivo 20x, una potencia de salida de 5 mW y 1 s de tiempo de integración para ambas microestructuras. En cada muestra se realizaron y promediaron cinco áreas de 200 μm \times 150 μm recogiendo 100 espectros en cada una.

Los experimentos de detección de paraoxon utilizando las micropirámides G0 y G1 se realizaron incubando los sustratos durante 40 min en 25 mL de cada una de las disoluciones de paraoxon siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.4.1, pág. 65. Se prepararon cinco concentraciones de paraoxon: 10⁻⁶ M, 10⁻⁹ M, 10⁻¹² M, 10⁻¹⁵ M y

¹¹ El contenido de este capítulo ha sido adaptado de la siguiente publicación científica:

M. Lafuente, E.J. Berenschot, R.M. Tiggelaar, S.G. Rodrigo, R. Mallada, N.R. Tas, M.P. Pina.

“Attomolar SERS detection of organophosphorous pesticide using silver mirror like micro-pyramid as active substrate”

Microchimica Acta, **2020**, 187:247. DOI: 10.1007/s00604-020-4216-9

10^{-18} M. Los sustratos se midieron “en seco”, es decir, tras lavar y secar al aire los sustratos previamente incubados en las disoluciones de paraoxon.

7.3.1.3 Simulación FDTD

Los cálculos teóricos de predicción de la amplificación del campo electromagnético sobre las estructuras G0 y G1 fueron realizados por el Dr. Sergio G. Rodrigo del Instituto de Ciencia de los Materiales de Aragón (ICMA) usando un código FDTD propio [439].

En todas las simulaciones se ha considerado a cada micropirámide como un elemento aislado del resto, puesto que la distancia entre éstas es lo suficientemente grande como para no producirse una retroiluminación directa o indirecta. Se utilizaron unas condiciones de contorno absorbentes para evitar reflejos de la luz al incidir con los límites de la celda de simulación. La constante dieléctrica de la plata fue extraída de datos tabulados e incorporada a FDTD a través del modelo de Drude-Lorentz¹² [440]. Las micropirámides G0 y G1 se iluminaron con un haz gaussiano polarizado en perpendicular a ellas. El diámetro del haz sobre las estructuras es de $2 \mu\text{m}$ intentado reproducir la iluminación con el láser utilizado en las medidas experimentales, $1,9 \mu\text{m}$ (ver Tabla 2.1, pág. 47). El tamaño de la malla fue suficiente para definir los campos EM sobre la estructura [439].

La ganancia SERS promedio α_i , se calculó según la Ecuación 7.1, definiéndose α_S , para una microestructura dada S, y α_M , para una superficie metálica plana M, donde los paréntesis representan el promedio de la integración del volumen SERS irradiado [439]. En la puesta en práctica de la Ecuación 7.1, la intensidad del campo eléctrico en la superficie del metal se considera como el promedio de los campos \vec{E}_S y \vec{E}_M dentro de cada celda del mallado en contacto con el metal. El campo incidente \vec{E}_0 se obtiene en el vacío en la misma posición \vec{r} y longitud de onda λ .

$$\alpha_i = \left\langle \frac{|\vec{E}_i(\vec{r}, \lambda)|^4}{|\vec{E}_0(\vec{r}, \lambda)|^4} \right\rangle \quad \text{Ecuación 7.1}$$

¹² El modelo de Drude-Lorentz proporciona una base de la mecánica clásica para la conductividad de los metales y se basa en la aplicación de la teoría cinética a los electrones en un sólido.

7.3.2 Resultados

7.3.2.1 Caracterización de las micropirámides SERS G0 y G1

La Figura 7.3 muestra las imágenes SEM de los sustratos SERS fabricados donde puede observarse la alta reproducibilidad del proceso de fabricación de las micropirámides de base cuadrada de generación G0 y G1. En ambos sustratos las micropirámides están separadas 20 μm , contando de centro a centro de pirámide, y tienen una base de 5,1 μm . La altura de la estructura G0 es de 3,7 μm y la altura de la G1 es de 7,7 μm (ver Figura 7.3e).

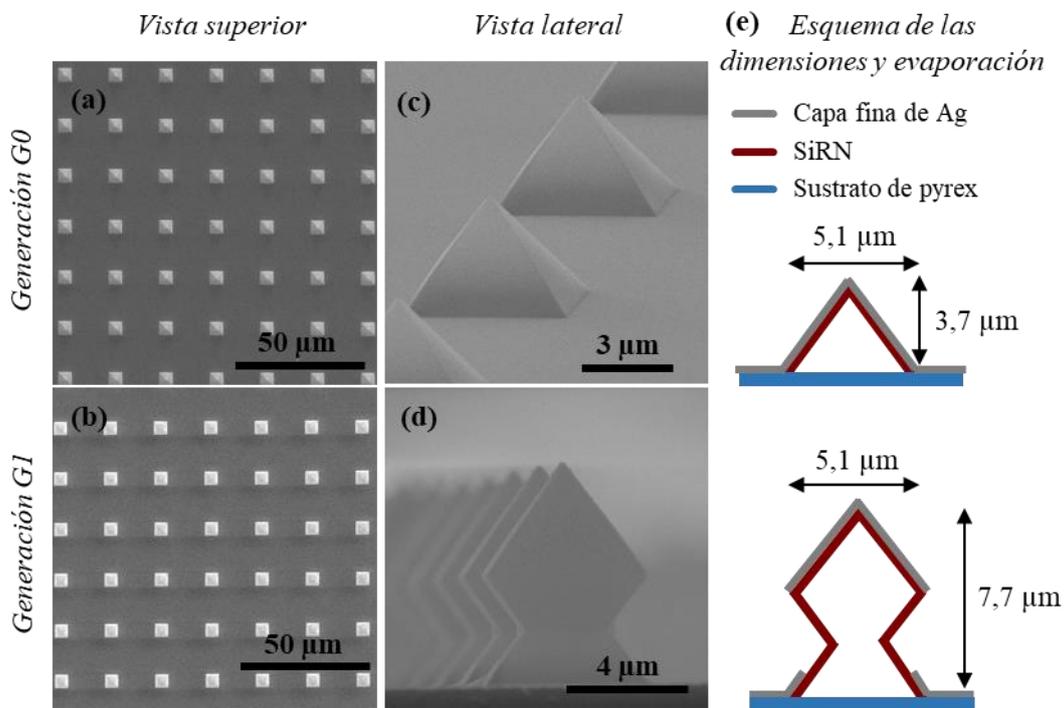


Figura 7.3 Imágenes SEM (a-b) vista superior y (c-d) vista lateral de las micropirámides de generación G0 (a y c) y de la generación G1 (b-d) tras el proceso de evaporación de una capa fina de plata. (e) Esquema de las dimensiones de las microestructuras G0 y G1.

El proceso de evaporación mediante haz de electrones es un proceso muy direccional recubriéndose de plata solo aquellas zonas de la micropirámide expuestas directamente a la fuente de plata (Figura 7.3e). En el caso de la generación G0 se forma una capa continua de plata sobre todo el sustrato SERS, micropirámide y pyrex plano. Por el contrario, en la generación G1 se recubrió la parte superior de la pirámide y el pyrex plano, formándose dos zonas recubiertas de plata separadas por la parte inferior de la micropirámide que no está recubierta. La parte inferior no se recubre porque la superior le hace “sombra” durante el proceso de evaporación. Para conocer el espesor exacto de la capa de plata

evaporada sobre las micropirámides G0 y G1 se prepararon lamelas de ambas que posteriormente se observaron al TEM. En el proceso de preparación de la lamela en primer lugar se recubre la estructura con platino para reforzarla y poder realizar el corte (ver Figura 7.4). En las imágenes SEM del proceso de fabricación de las lamelas podemos observar que las micropirámides G0 y G1 son huecas por dentro (Figura 7.4). El espesor de la capa de plata sobre la estructura G0 fue de 40 ± 7 nm y sobre la estructura G1 45 ± 6 nm (Figura 7.5).

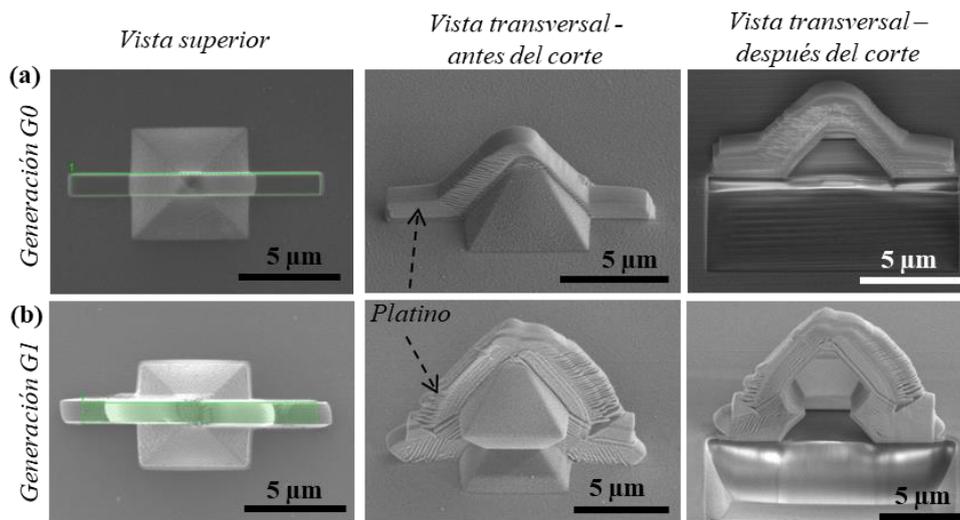


Figura 7.4 Imágenes SEM del proceso de fabricación de las lamelas de las micropirámides G0 (a) y G1 (b).

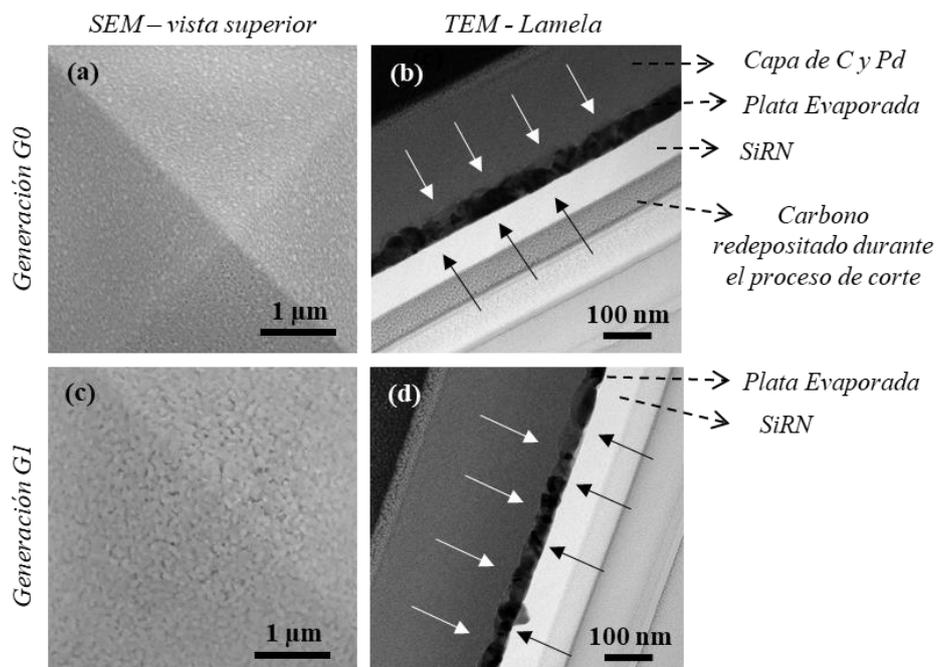


Figura 7.5 Imágenes SEM (a) y (c) y TEM (b) y (d) de la capa de plata evaporada sobre las microestructuras G0 y G1. Las flechas señalan la capa de Ag.

7.3.2.2 Cálculo de AEF de las micropirámides con 4-NBT

En primer lugar, estudiamos la capacidad de las micropirámides G0 y G1 para aumentar la señal Raman. Las imágenes de las áreas muestreadas de los sustratos G0 y G1 recogidas con el microscopio óptico del equipo Raman, así como, los correspondientes mapas de intensidad Raman del pico desplazado a 1338 cm^{-1} del 4-NBT aparecen en la Figura 7.6. En los mapas de intensidad Raman se pueden observar claramente dos zonas, una más brillante correspondiente a las zonas con micropirámides, G0 o G1, y una zona oscura carente de estructuras. La intensidad de la señal en las pirámides G1 es cerca de 5 veces superior a la del G0. La intensidad promedio del pico a 1338 cm^{-1} del 4-NBT recogido sobre el sustrato G1 fue $1389 \pm 185\text{ cts}$ (RSD = 13%) y sobre G0 $290 \pm 56\text{ cts}$ (RSD = 19%).

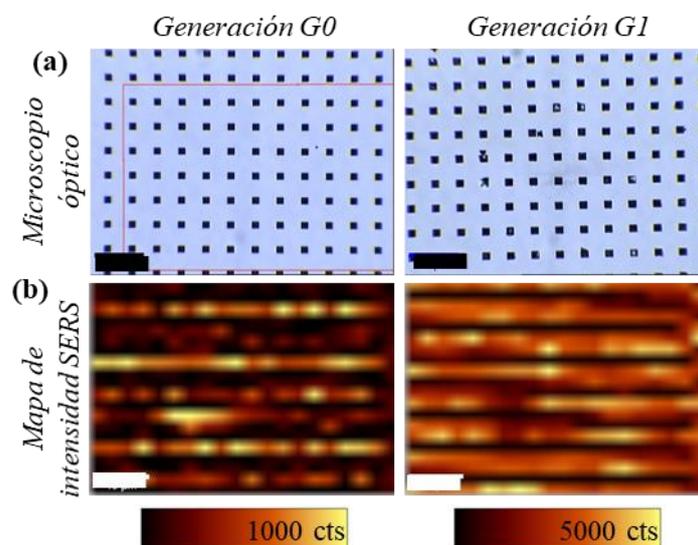


Figura 7.6 Caracterización de las micropirámides G0 y G1 con 4-NBT: (a) imagen recogida con el microscopio óptico del equipo Raman Alpha 300; (b) mapa de intensidad Raman del pico a 1338 cm^{-1} del 4-NBT recogido en ambos sustratos. La escala representa $40\text{ }\mu\text{m}$.

La Figura 7.7 muestra el espectro promedio del 4-NBT recogido sobre los sustratos SERS G0, G1 y el pyrex plano recubiertos con $\sim 40\text{ nm}$ de Ag, así como, el espectro de referencia del 4-NBT puro medido en estado sólido. Las bandas características del 4-NBT desplazadas a 747 cm^{-1} , 1338 cm^{-1} y 1532 cm^{-1} y correspondientes a los modos vibracionales C-S *stretching*, NO₂ *stretching* y C-C *stretching*, respectivamente, son claramente observables sobre las micropirámides G0 y G1, en contraste con el sustrato plano de pyrex donde no se obtuvo señal. El mayor cambio de intensidad relativa se observa en el pico desplazado a 747 cm^{-1} correspondiente al modo vibracional que está

implicado en la interacción entre la molécula y la plata metálica, interacción S-Ag, ampliamente reportada en literatura [156,218,247]

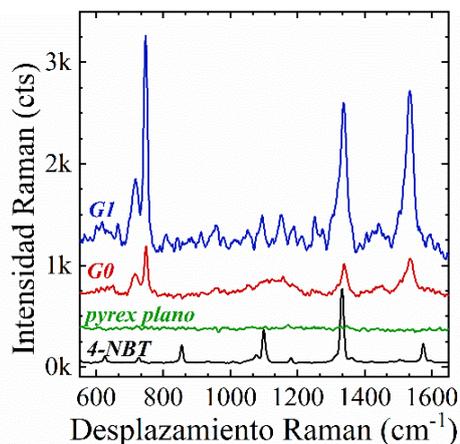


Figura 7.7 Espectro SERS del 4-NBT 1 μM recogido sobre las micropirámides SERS G0 y G1 y el sustrato plano de pyrex comparados con el espectro del 4-NBT puro sólido. Los espectros han sido desplazados en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados.

Del promedio de los 500 espectros recogidos en cinco diferentes mapeos sobre los sustratos SERS G0 y G1 se calculó el AEF con la intensidad promedio de toda el área, usando la Ecuación 2.4 (pág. 50) obteniéndose unos valores de $1,3 \times 10^5$ y $6,4 \times 10^5$ para las micropirámides G0 y G1, respectivamente, y un ratio $\text{AEF}_{\text{G1}}/\text{AEF}_{\text{G0}}$ de ~ 5 . Si el cálculo se realiza sólo con los máximos valores de intensidad que se dan en las pirámides, se obtienen unos valores mayores al doble $4,7 \times 10^5$ y $1,7 \times 10^6$ para G0 y G1, respectivamente.

7.3.2.3 Capacidad de detección de pesticidas en fase líquida

La capacidades de detección de paraoxon-metil en fase líquida se estudió con el sustrato SERS que mejores resultados había ofrecido, las micropirámides G1. Siguiendo la misma metodología que para el 4-NBT, los sustratos se incubaron en una disolución etanólica de paraoxon 1 μM durante 40 min y se lavaron y secaron antes de llevarlos al equipo Raman para su caracterización.

La Figura 7.8 muestra el espectro promedio de diferentes concentraciones de paraoxon recogido sobre el sustrato de micropirámides G1. Hasta diez modos vibracionales del paraoxon son claramente distinguible en el rango de concentraciones medidas, 10^{-6} M - 10^{-18} M, las etiquetas *a-l* se corresponden con la nomenclatura de la Tabla 2.9, pág. 65. Los modos vibracionales que sufrieron un mayor cambio de intensidad

relativa respecto al paraoxon puro son aquellos en los que se ve envuelto el grupo funcional nitro, $-\text{NO}_2$. Los picos afectados fueron los desplazados a 634 cm^{-1} (banda b – NO_2 *scissor*), 746 cm^{-1} (banda c - NO_2 *scissor*), 1145 cm^{-1} (banda f - NO_2 *stretching* asimétrico), 1338 cm^{-1} (banda i - NO_2 *stretching* simétrico) y 1532 cm^{-1} (banda k - NO_2 *stretching* antisimétrico). Una posible explicación a este cambio de intensidades es que haya una interacción electrostática entre la carga parcialmente positiva del grupo $-\text{NO}_2$ del paraoxon y la carga negativa del metal.

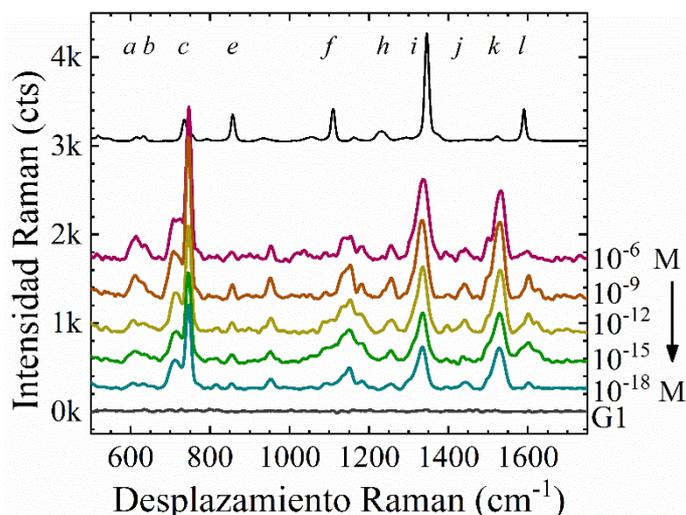


Figura 7.8 Espectro SERS de diferentes concentraciones de paraoxon (10^{-6} M – 10^{-18} M) recogidas sobre las micropirámides G1, junto con el espectro Raman del paraoxon puro. Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados. Para más información sobre la asignación de picos ver Tabla 2.9 (pág. 65).

En la Figura 7.9 aparecen los mapas de intensidad de los picos desplazados a 746 cm^{-1} y 1338 cm^{-1} , bandas c e i, respectivamente, en función de la concentración de paraoxon. Como puede observarse, para ambos picos tanto la intensidad como la densidad de los “hot-spots” disminuye conforme disminuye la concentración de paraoxon de 10^{-6} M a 10^{-18} M . Si consideramos una distribución homogénea de las moléculas sobre todo el sustrato G1, para la concentración de 10^{-18} M podríamos tener un máximo de 23 moléculas por área muestreada ($200\text{ }\mu\text{m} \times 150\text{ }\mu\text{m}$) y ese número de moléculas coincide más o menos con el número de puntos de máxima intensidad (Figura 7.9). Para más información sobre los cálculos ver Anexo VI, pág. 271. Los mejores resultados reportados en la literatura, para paraoxon con la técnica SERS, se refieren a nanopartículas de oro que mediante detección indirecta, a través de la acetilcolinasa, llegan a detectar una concentración de $4 \times 10^{-15}\text{ M}$ [246]. Este valor es tres órdenes de magnitud superior a la menor concentración estudiada en este trabajo 10^{-18} M .

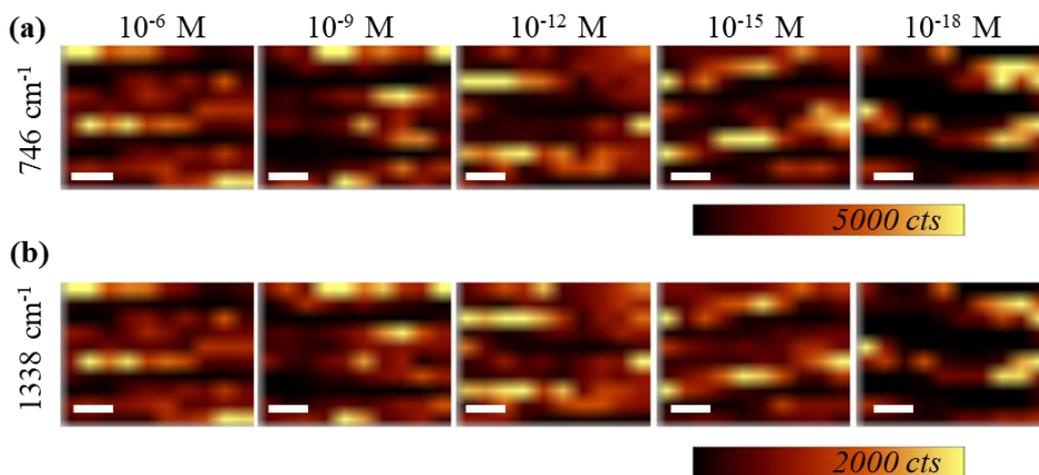


Figura 7.9 Áreas SERS en función de la concentración de paraoxon recogidas sobre el sustrato de micropirámides G1 monitorizando la intensidad de los picos desplazados a (a) 746 cm^{-1} (NO_2 scissor) y (b) 1338 cm^{-1} (NO_2 stretching simétrico).

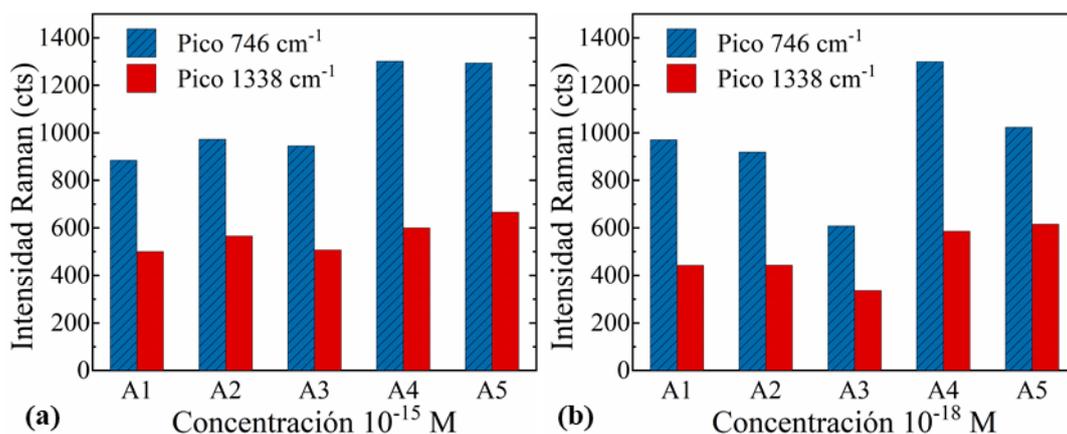


Figura 7.10 Intensidad promedio de los picos desplazados a 746 cm^{-1} y 1338 cm^{-1} para las concentraciones de (a) 10^{-15} M y (b) 10^{-18} M de paraoxon medidos sobre el sustrato G1.

La intensidad promedio de los picos de paraoxon desplazados a 746 cm^{-1} y 1338 cm^{-1} recogidos en cinco áreas diferentes para las concentraciones de 10^{-15} M y 10^{-18} M aparecen en la Figura 7.10. Como puede observarse, la señal del pico a 746 cm^{-1} es mayor que la del pico a 1338 cm^{-1} . La RSD para la menor concentración medida fue del 26% para el pico a 746 cm^{-1} y del 24% para la del pico a 1338 cm^{-1} . Esta desviación estándar relativamente alta puede deberse a que estamos estudiando, mapeando y promediando la señal de grandes áreas, y a concentraciones muy bajas hay pocas moléculas, por lo que hay una alta probabilidad de no encontrar ninguna. Por consiguiente, al aumentar la concentración de paraoxon la desviación estándar disminuye puesto que la probabilidad de encontrar moléculas de paraoxon aumenta (Figura 7.11 y

Tabla 7.2). Por su parte, la intensidad aumenta hasta la concentración de 10^{-12} M que coincide con la concentración a la que la monocapa de paraoxon ya estaría completamente formada sobre la micropirámide G1. Para concentraciones mayores, consideramos que las moléculas de paraoxon comienzan a depositarse sobre la capa de Ag de la zona de pyrex plano, menos activa en SERS. Este comportamiento explicaría la existencia de dos regiones de diferencias cuando analizamos la señal SERS en función de la concentración de paraoxon (Figura 7.11). La monocapa sobre G1 se formará con las moléculas presentes en la disolución de concentración 10^{-12} M, y, por tanto, incrementar en mayores concentraciones no aumenta el número de moléculas adsorbidas en la capa metálica de la microestructura G1. Para más información sobre los cálculos ver Anexo VI, pág. 271.

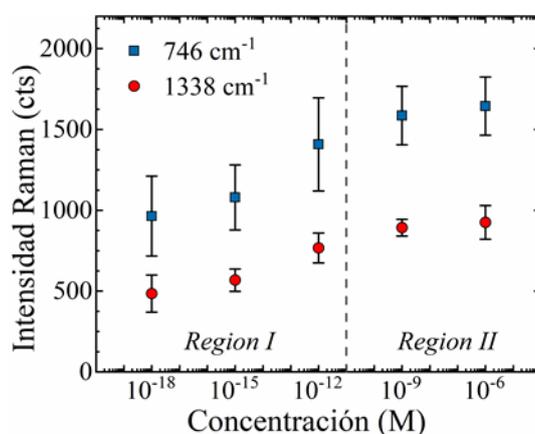


Figura 7.11 Intensidad SERS de los picos desplazados a 746 cm^{-1} y 1338 cm^{-1} en función de la concentración de paraoxon. Las barras de error representan la desviación estándar de 5 áreas (500 espectros).

Tabla 7.2 Intensidades SERS promedio y desviación estándar de los picos a 746 cm^{-1} y 1338 cm^{-1} en función de la concentración de paraoxon.

Concentración paraoxon	Pico a 746 cm^{-1}		Pico a 1338 cm^{-1}	
	Intensidad promedio \pm desv. Estandar (cts)	RSD (%)	Intensidad promedio \pm desv. Estandar (cts)	RSD (%)
10^{-6} M	1644 ± 180	11	925 ± 104	11
10^{-9} M	1586 ± 181	11	892 ± 52	6
10^{-12} M	1408 ± 288	20	767 ± 93	12
10^{-15} M	1080 ± 201	19	568 ± 69	12
10^{-18} M	964 ± 247	26	485 ± 115	24

En la Figura 7.11 y Tabla 7.2 también podemos observar que la diferencia de intensidad SERS entre la concentración de 10^{-6} M y 10^{-18} M es de apenas ~ 1000 cts. Los

resultados de los cálculos computacionales sobre el origen de la amplificación del campo electromagnético en las micropirámides, que se presentan a continuación, nos ayudan a explicar estos resultados.

7.3.2.4 Simulación FDTD en las micropirámides

El promedio de la ganancia SERS sobre las micropirámides G0 y G1, según la Ecuación 7.1, para las longitudes de onda de excitación del visible e infrarrojo cercano aparecen en la Figura 7.12a. En las estructuras G0 y G1 sólo se consideró la amplificación proveniente de la estructura metálica, despreciándose los campos originados sobre la superficie plana que las rodea. La respuesta espectral de ambas micropirámides es muy similar, un conjunto de picos y valles a lo largo de todo el rango estudiado. En promedio la ganancia SERS de la micropirámide G1 es algo mayor que la de la pirámide G0, coincidiendo con los resultados experimentales de AEF. Por otro lado, y en concordancia con lo observado experimentalmente con el 4-NBT, la ganancia SERS promedio de un sustrato plano de pyrex (α_M en Figura 7.12a) mucho menor, incluso dos órdenes de magnitud inferior a las alcanzadas por las micropirámides G0 y G1. La Figura 7.12b muestra los resultados de la simulación FDTD de la intensidad del campo eléctrico en el plano transversal y longitudinal de la micropirámide G1 excitada con una longitud de onda de 785 nm. En esta figura podemos observar que la mayor amplificación del campo se produce sobre la parte superior de la micropirámide G1.

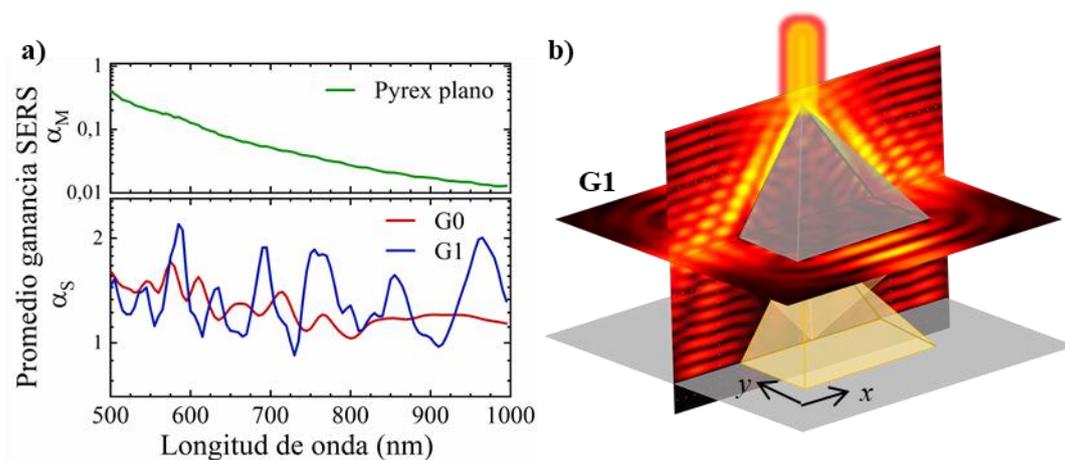


Figura 7.12 (a) Promedio de la ganancia SERS calculada a través de la Ecuación 7.1 para las microestructura G1 (azul) y G0 (rojo), para comparar se adjunta la el promedio de la ganancia de un sustrato de pyrex plano. Los tres sustratos recubiertos de 40 nm de Ag. **(b)** Intensidad del campo eléctrico a 785 nm en el corte transversal y longitudinal de la microestructura G1.

La distribución de la ganancia SERS sobre G1 para tres longitudes de onda de excitación diferentes aparece en la Figura 7.13 mostrando los denominados *Edge Plasmon Polaritons* (EPP) que se generan sobre las aristas de las micropirámides G1, subgrupo de los polaritones de plasmones de superficie (SPP), ver apartado 1.3.1 (pág. 14). Podríamos decir que toda la pirámide, y en particular las aristas, se comportan como un resonador óptico. Como hemos comentado los resonadores ópticos o cavidades ópticas son dispositivos en los que algunas longitudes de onda, y sus ondas asociadas, son susceptibles de permanecer confinadas, estas ondas son las denominadas modos de resonancia. En nuestro caso, la onda se desplazaría a lo largo de las aristas, de vértice a vértice. El número de nodos sobre la arista decrece conforme aumenta la longitud de onda [441], pasando de 3 en la longitud de onda de 545 nm a 1 para la longitud de onda de excitación de 965 nm. La onda que genera los EPPs sobre las aristas está representada en los paneles superiores de la Figura 7.13, la línea punteada representa la arista, y los nodos se corresponden con las zonas más oscuras. Asimismo, en la Figura 7.13 también podemos observar *breathing modes* sobre las caras laterales de la micropirámide, las zonas más intensas en las caras. Estos modos contribuyen a la amplificación de la señal menos que los EPPs.

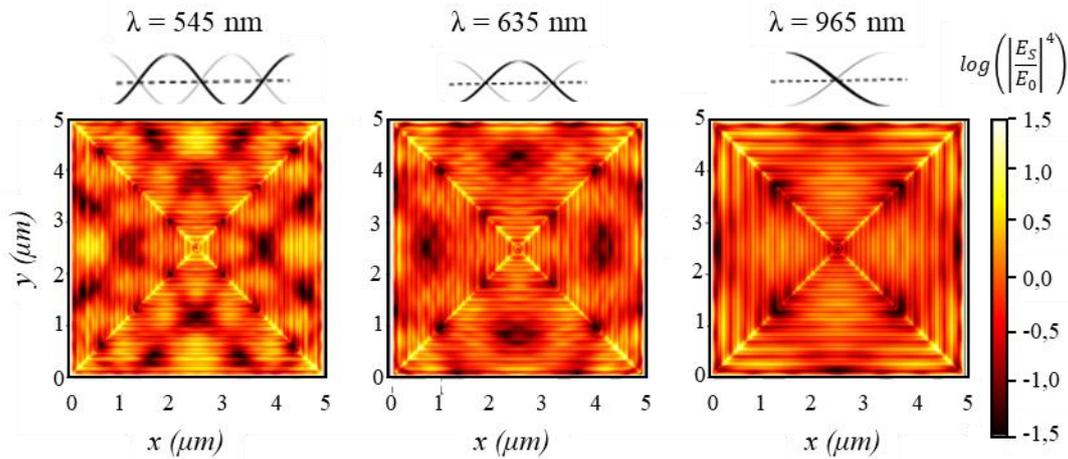


Figura 7.13 Representación logarítmica de la distribución de la ganancia SERS sobre la superficie de la micropirámide G1 para tres resonancias plasmónicas diferentes. La onda que genera los EPPs sobre las aristas está representada en la parte superior.

Teniendo en cuenta estos resultados, nuestra hipótesis es que a bajas concentraciones de paraoxon, todas las moléculas se sitúan sobre las aristas, las zonas más activas en SERS y donde se produce la mayor amplificación de la señal. La adsorción preferencial de las moléculas sobre las aristas estaría impulsada por los defectos de grano que se producen

en estas zonas de las micropirámides, y favorecida termodinámicamente puesto que se minimizaría la energía libre en ellas. Dicho de otro modo, las moléculas en el rango de concentraciones de 10^{-18} M a 10^{-12} M, región I de la Figura 7.11, se adsorberían preferencialmente sobre las aristas de las micropirámides donde se produce la mayor concentración de *hot-spots* y el mayor aumento de la señal.

Esta adsorción preferencial explicaría los resultados observados en la Figura 7.11. La monocapa de paraoxon sobre la micropirámide G1 acabaría de formarse para la concentración de $\sim 10^{-11}$ M (ver Anexo VI, pág. 271), siempre considerando que el área de una molécula de paraoxon es $0,2 \text{ nm}^2$ [442]. Esta monocapa cubre todos los modos plasmónicos presentes en la estructura EPPs sobre las aristas y *breathing modes* sobre las caras laterales. Por eso, cuando aumentamos la concentración y pasamos al rango de 10^{-12} M – 10^{-6} M, región II de la Figura 7.11, no observamos grandes cambios de intensidad, cada nueva molécula se está adsorbiendo sobre la parte plana que rodea las micropirámides, menos activa en SERS, como han demostrado los resultados de simulación de sustratos de pyrex plano. Finalmente, remarcar que la zona plana del sustrato SERS formado por micropirámides G1 supone un 90% de la superficie escaneada, esto nos ofrece una idea de la extraordinaria amplificación de la señal que proviene de las aristas de la micropirámide.

Debido al gran tamaño de las microestructuras, se pueden localizar y enfocar fácilmente, se decidió que se podían medir las micropirámides de manera individual en lugar de promediar la intensidad de grandes áreas. Así se intentará reducir la desviación estándar de las medidas y aumentar la señal obtenida, esta será la metodología utilizada en el siguiente apartado, en el que la detección es para agentes en fase gas.

7.4 ESTRUCTURAS FRACTALES 3D RECUBIERTAS DE PLATA Y ORO PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS¹³

Este apartado hemos querido combinar el acoplamiento plasmónico de las nanopartículas con los plasmones propagantes EPPs y *breathing modes* encontrados sobre las micropirámides. Para ello, hemos utilizado microestructuras de generación G1 y G3 recubiertas por una capa fina de plata y nanopartículas de oro estabilizadas con citrato (AuNP@citrato). Finalmente, hemos estudiado sus propiedades plasmónicas y su aplicación como sensor SERS en la detección en continuo de DMMP en fase gas.

7.4.1 Procedimiento experimental

7.4.1.1 Materiales

Ácido cloroaúrico (HAuCl₄, ~ 50% básico), citrato de sodio tribásico dihidratado (>99%), cloruro de poli(alildimetilamonio) (PDDA, 20% en peso) y rodamina 6G (R6G) se compraron en Sigma Aldrich y se usaron como se recibieron. Todas las disoluciones se prepararon con agua destilada. Los pellets de plata (99,999 %) utilizados en la preparación de capas finas de este metal se adquirieron en Kurt J. Lesker Company. Las obleas de silicio con 1 μm de óxido de silicio térmicamente depositado (SiO₂/Si) se adquirieron en SilTronix.

7.4.1.2 Preparación de los sustratos SERS

Se prepararon tres sustratos SERS diferentes (Figura 7.14). Microestructuras G1 y G3, y una oblea de pyrex plano sobre los que se evaporó una capa de plata metálica y posteriormente mediante un proceso LbL se depositaron nanopartículas de oro recubiertas de citrato, en adelante AuNP@citrato.

¹³ El contenido de este capítulo ha sido adaptado de la siguiente publicación científica:

M. Lafuente, E. J. W. Berenschot, R. M. Tiggelaar, R. Mallada, N. R. Tas, M.P. Pina

“3D Fractals as SERS Active Platforms: Preparation and Evaluation for Gas Phase Detection of G-Nerve Agents”

Micromachines, **2018**, 9, 60. DOI: 10.3390/mi9020060

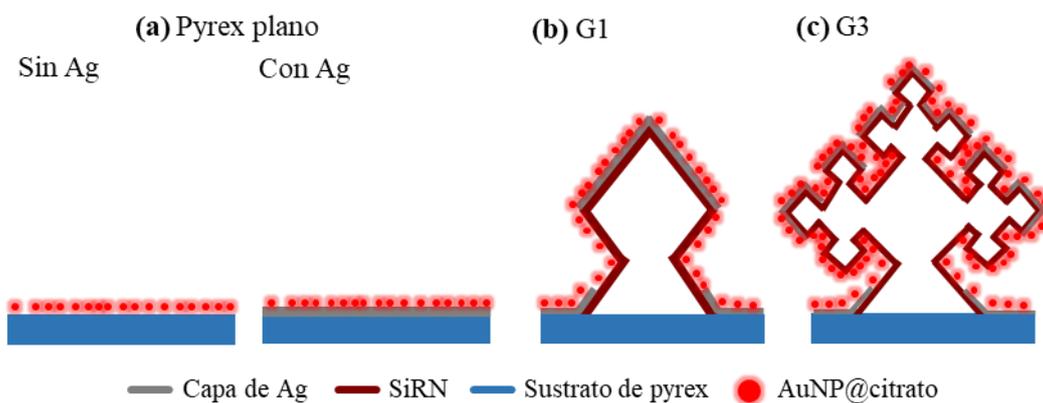


Figura 7.14 Ilustración del corte transversal de los sustratos SERS preparados: (a) pyrex plano, (b) micropirámides G1 y (c) micropirámides G3. Todos se recubrieron con 77 nm de Ag y nanopartículas de oro, AuNP@cittrato.

Las micropirámides G1 y G3 fueron fabricadas mediante una combinación de *corner lithography* y ataques anisotrópicos del silicio según se ha descrito en el apartado 7.2, página 198. Tras la fabricación se recubrieron con una capa de plata de 77 nm mediante evaporación por haz de electrones, tiempo de evaporación 300 s. Los sustratos SERS se cortaron en piezas de 1 cm² y se incubaron en posición vertical en una disolución de PDDA (0,2 % v/v) durante 4 h, tras las cuales se lavaron con abundante agua destilada y se secaron durante 10 min en un horno a 110 °C. Tras este tiempo, los sustratos se introdujeron en la suspensión de AuNP@cittrato a una temperatura de 4 °C durante 16 horas. Finalmente, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las AuNP@cittrato se sintetizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2.1.2, pág. 88. Los sustratos SERS se caracterizaron mediante diversas técnicas que se irán detallando a lo largo del capítulo. Para más información sobre estas técnicas ver Anexo I.

Se calculó el AEF de los sustratos SERS utilizando R6G como molécula patrón, y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2, pág. 50. Las medidas Raman-SERS se realizaron con el equipo Alpha 300 de sobremesa, la longitud de onda de excitación de 785 nm y el objetivo 50x. En general, y a no ser que se especifique lo contrario, en el cálculo del AEF se utilizó una potencia del láser de 1,6 mW y 0,1 s de tiempo de integración, y en las medidas de detección de DMMP 5 mW y 1 s. En las medidas del DMMP en fase gas se hicieron con el horizontal shift de 0,05 MHz. Los vapores de DMMP de 1200 ppbV (1,2 ppmV) se generaron usando un tubo de permeación calibrado (ver 2.3.4.1, pág. 57) con un caudal constante de N₂ de 10 mL/min hasta la celda de gases.

7.4.2 Resultados

7.4.2.1 Caracterización de los sustratos SERS

La Tabla 7.3 muestran las principales características de los sustratos SERS preparados. En ambos sustratos las micropirámides están separadas 20 μm , contando de centro a centro de pirámide. La altura de la G1 es de 7,7 μm y la de G3 12 μm (Figura 7.15).

Tabla 7.3 Principales características de los sustratos SERS preparados.

Muestra	Sustrato	Espesor capa de Ag (nm)	Densidad de AuNP@citrato ($\text{AuNP}/\mu\text{m}^2$)
Pyrex_Ag	Pyrex plano	77	-
Pyrex_AuNP	Pyrex plano	-	623 ± 8
Pyrex_Ag_AuNP	Pyrex plano	77	633 ± 30
G1_Ag_AuNP	G1	77	619 ± 4
G3_Ag_AuNP	G3	77	561 ± 16

El ensamblaje de las nanopartículas AuNP@citrato (22 ± 9 nm diámetro) utilizando el protocolo de LbL seleccionado permitió obtener recubrimientos homogéneos de AuNP@citrato con una densidad de nanopartículas de unas 600 nanopartículas/ μm^2 , lo que supone alrededor de un 25% de recubrimiento de la superficie del sustrato (Figura 7.15). La densidad AuNP@citrato de los sustratos planos es alrededor de un 6% superior comparada con los recubrimientos sobre las micropirámides G1 y G3, similar a la de los sustratos que no fueron evaporados con Ag. El valor de recubrimiento obtenido para el pyrex_AuNP es ligeramente inferior al obtenido con la misma técnica de deposición sobre SiO_2/Si , 30% (apartado 4.2.2.1, pág. 90).

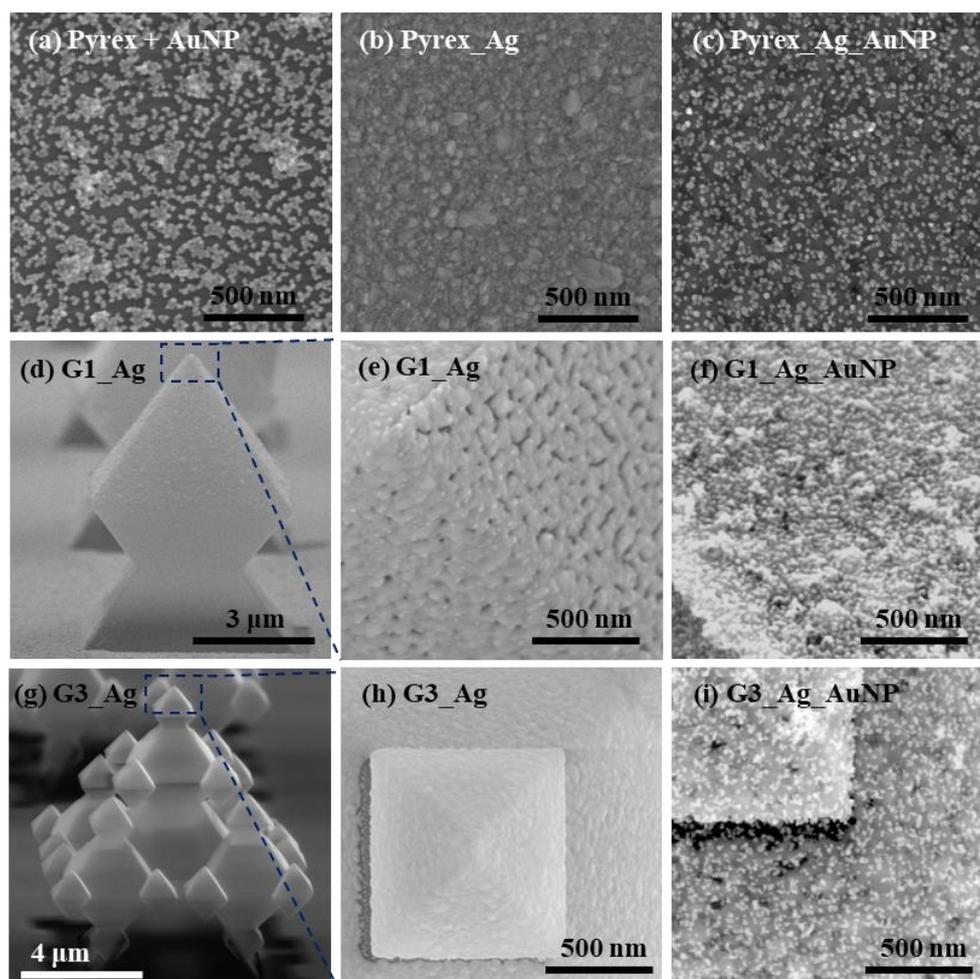


Figura 7.15 Caracterización SEM de los sustratos SERS preparados: (a) pyrex_AuNP, (b) pyrex_Ag, (c) pyrex_Ag_AuNP, (d) G1_Ag y (e) amplificación de la parte superior de (d); (f) parte superior de G1_Ag_AuNP; (g) G3_Ag y (h) amplificación de la parte superior de (g); y (i) parte superior de G3_Ag_AuNP.

7.4.2.2 Cálculo del AEF con R6G

El cálculo del AEF se realizó usando la Ecuación 2.4 (pág. 50) donde I_{SERS} fue el promedio de 10 espectros medidos sobre la punta de diferentes pirámides, usando el objetivo 50x, a diferencia del caso anterior de las pirámides G0 y G1 (apartado 7.3.2.2, pág. 205) en el que se realizó un *mapping* con el objetivo 20x. En la Figura 7.16 aparecen los espectros SERS de la R6G 1 μ M medidos sobre pyrex_Ag_AuNP, G1_Ag_AuNP y G3_Ag_AuNP. Como podemos observar la intensidad SERS es mayor sobre las microestructuras que sobre el pyrex plano. Ambas microestructuras presentan una intensidad muy similar siendo ligeramente superior la obtenida sobre G3. Los valores de AEF fueron $3,2 \times 10^6$, $3,1 \times 10^7$, $3,8 \times 10^7$ para pyrex, G1 y G3, respectivamente. Si comparamos estos valores con los obtenidos sobre la microestructura G1_Ag ($1,7 \times 10^6$,

pág. 205), observamos que el AEF aumenta un orden de magnitud. El origen de este aumento estaría ligado a los acoplamientos partícula-partícula y partícula-capa metálica, resultando complicado elucidar en que magnitud contribuye cada uno de ellos.

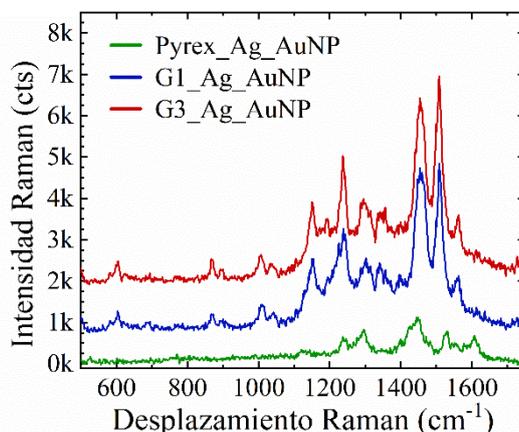


Figura 7.16 Espectro SERS de la R6G 1 μM recogido sobre los sustratos SERS: pyrex_Ag_AuNP (verde), G1_Ag_AuNP (azul) y G3_Ag_AuNP (rojo). Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados.

Por otro lado, el AEF del pyrex_Ag_AuNP es del mismo orden, pero ligeramente menor que el obtenido con las obleas de SiO_2/Si recubiertas con AuNP@cittrato ($9,19 \times 10^6$). La causa podría ser la menor densidad de recubrimiento de nanopartículas sobre el sustrato pyrex que reduciría el efecto plasmónico del acoplamiento interpartícula; sin embargo, la magnitud de esta reducción podría haber estado compensada por el acoplamiento nanopartícula-capa de metálica de Ag. Esta ligera diferencia de densidad de recubrimientos nos impide conocer con exactitud la magnitud del acoplamiento partícula-capa metálica. Es importante recordar, que una capa metálica de este espesor sobre un sustrato plano continuo no tiene efecto plasmónico *per se* cómo ya nos señalaron los resultados del pyrex evaporado con 40 nm de Ag en el apartado anterior, y que sólo puede influir mediante su interacción con la nanopartícula.

El origen de la amplificación de la señal se ha intentado confirmar a través de los espectros de absorción de los distintos sustratos SERS (Figura 7.17). Como era de esperar, el pyrex_Ag no presenta respuesta espectral a 785 nm, al contrario del pyrex_AuNP que debido al acoplamiento partícula-partícula presenta una gran absorción en esta región del espectro. Por su parte, el pyrex_Ag_AuNP (espectro verde en Figura 7.17) al ser una mezcla de los dos anteriores presenta una respuesta intermedia a ellos, coincidiendo con los valores de AEF. Esta respuesta probablemente este debida a que el acoplamiento partícula-partícula este siendo *quencheado* por la capa metálica continua de Ag. Las

pirámides G1 (espectro azul en Figura 7.17) presentan una mayor absorción UV-Vis que el pyrex_Ag_AuNP. La causa es que la capa metálica de Ag sobre G1 puede soportar modos plasmónicos EPPs sobre sus aristas y *breathing modes* sobre sus caras que evitan el *quenching* del acoplamiento partícula-partícula y partícula-capa metálica.

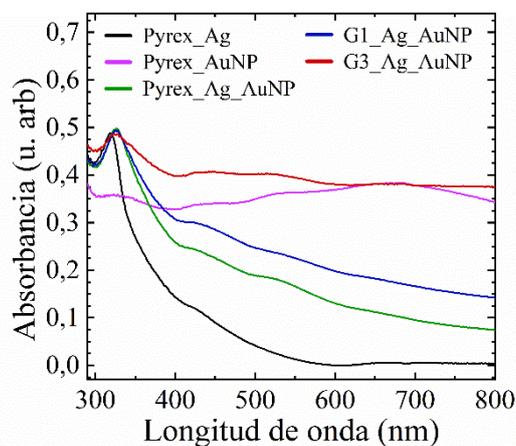


Figura 7.17 Espectro UV-Vis de los sustratos SERS preparados.

Otra característica que diferencia a estos sustratos 3D es que podemos extender la superficie SERS activa en el eje z . Para corroborarlo, sobre la estructura G3_Ag_AuNP se realizó un estudio de la amplificación de la señal en función de la altura. Para ello se escanearon áreas de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ y recogiendo 200 espectros a cinco alturas de la micropirámide G3: suelo ($0\ \mu\text{m}$), 5, 8, 10 y $12\ \mu\text{m}$. Las zonas más brillantes se corresponden con la mayor amplificación de la señal y si nos fijamos estas zonas van dibujando el patrón de la estructura G3 situándose sobre los octógonos y sus aristas. La mayor concentración de octógonos se produce en torno a $8\ \mu\text{m}$ y es en esta altura donde observamos la mayor amplificación del EM.

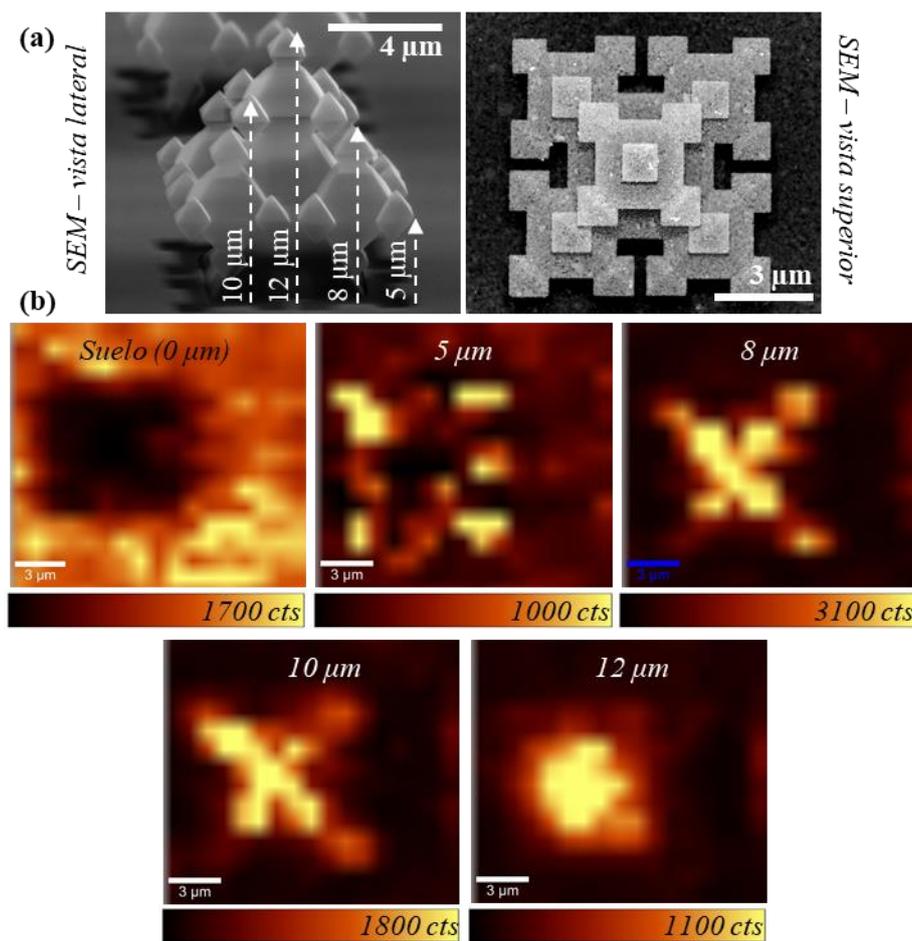


Figura 7.18 Amplificación de la señal Raman sobre la estructura G3_Ag_AuNP. (a) imágenes SEM y (b) áreas SERS a diferentes alturas de la microestructura G3: 0, 5, 8, 10 y 12 μm. La escala representa 3 μm.

En conclusión, podemos decir que estas microestructuras G1 y G3 nos han permitido combinar los plasmones propagantes EPPs generados sobre las aristas de las estructuras y los *breathing modes* de las caras con los plasmones producidos por el acoplamiento partícula-partícula y partícula-capa metálica de Ag. El aumento de la señal es muy similar para ambas microestructuras y dado que la fabricación de G1 es más sencilla, los experimentos de detección se realizaron con las micropirámides G1_Ag_AuNP.

7.4.2.3 Detección de DMMP en fase gas

Las capacidades de detección de los sustratos G1_Ag_AuNP se estudiaron usando como analito diana vapores de DMMP con una concentración de 1,2 ppmV. La Figura 7.19 muestra los espectros SERS del DMMP recogidos sobre microestructura G1 y sobre el suelo, correspondencia con medir pyrex_Ag_AuNP. La mayor amplificación de la señal se recogió sobre la parte superior de la micropirámide G1 (a ~7,5 μm del suelo)

obteniéndose picos más nítidos y con menor ruido de fondo. El modo vibracional principal del DMMP correspondiente al enlace P-C se detectó en ambas alturas (banda *c* de la Figura 7.19). La banda correspondiente al PO₃ (497 cm⁻¹, banda *b*) también es observable en las dos alturas y la del PO₂ (782 cm⁻¹, bandas *d/e*) se recoge con claridad a 7,5 μm, pero en el suelo solo se intuye. Asimismo, a 7,5 μm observamos la banda correspondiente al modo vibracional POCH₃ (462 cm⁻¹, bandas *a*). Las bandas *g* y *h* se corresponden con los modos vibracionales del enlace C-O común entre DMMP y citrato por lo que no podemos asegurar su origen.

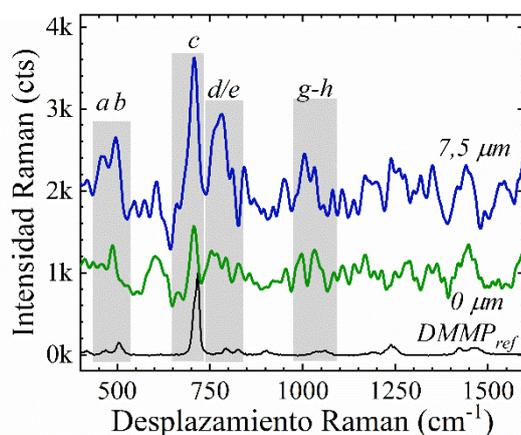


Figura 7.19 Espectros SERS del DMMP (1,2 ppmV) recogido sobre la parte superior de la micropirámide G1_Ag_AuNP y en el suelo que la rodea (correspondencia con medir un pyrex_Ag_AuNP) comparados con el espectro del DMMP puro. Los espectros se han desplazado en el eje-y para una mejor interpretación de los resultados. La etiqueta de las bandas se corresponde con la asignación de la Tabla 2.5 (pág. 55).

El anclaje de la molécula de DMMP a la superficie metálica se realizó mediante la interacción por puentes de hidrógeno del citrato que recubre las AuNP con el grupo P=O del DMMP, como se vio en el Capítulo 4 (apartado 4.2.2.3, pág. 95). Esta interacción se observa en el desplazamiento de la banda P-C a menores frecuencias, 706 cm⁻¹.

La homogeneidad y reproducibilidad del proceso de fabricación del sustrato SERS se evaluó midiendo dos sustratos G1_Ag_AuNP distintos expuestos a los vapores de DMMP. El promedio de las intensidades de los picos desplazados a 706 cm⁻¹ y 782 cm⁻¹ recogidas en el suelo y en la parte superior de la micropirámide G1 aparecen en la Figura 7.20a. En ambos sustratos la mayor amplificación se obtiene sobre G1 además de presentar una menor RSD 10% en comparación con el suelo 31%. En particular, la desviación estándar de los picos a 706 cm⁻¹ y 782 cm⁻¹ sobre la microestructura G1 fue

de un 7% y un 14%, respectivamente. Estos resultados nos señalan la alta reproducibilidad de la señal y del proceso de fabricación de las microestructuras G1.

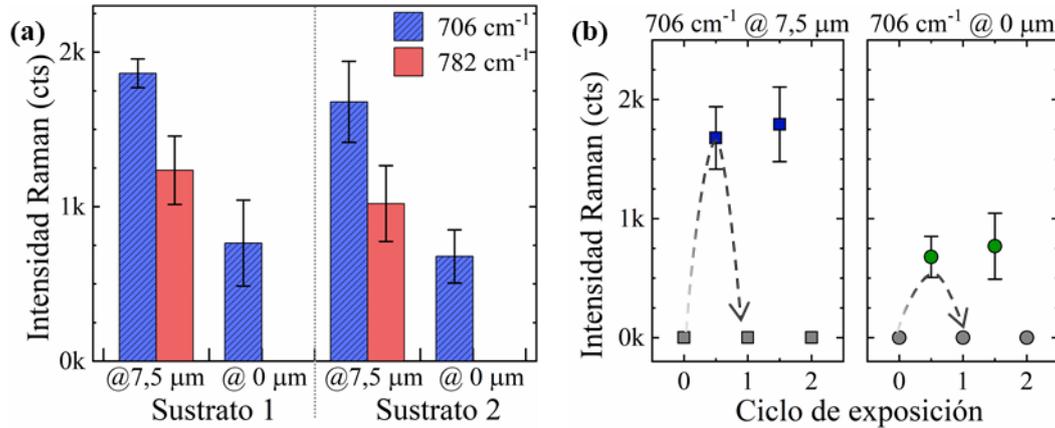


Figura 7.20 (a) Intensidad promedio del pico a 706 cm^{-1} y 782 cm^{-1} recogidos sobre el suelo y la parte superior de dos sustratos G1_Ag_AuNP. **(b)** Evolución de la intensidad SERS del pico de DMMP desplazado a 706 cm^{-1} en función de dos ciclos de adsorción de 1,2 ppmV - desorción con N_2 de DMMP de la superficie de G1_Ag_AuNP. La flecha indica un ciclo de adsorción/desorción. Las barras representan la desviación estándar de 6 medidas.

Finalmente, se confirmó la reusabilidad de las micropirámides G1_Ag_AuNP realizando dos ciclos de adsorción/desorción del DMMP de la superficie del sustrato. Cada ciclo de adsorción/desorción consistió en 10 min pasando DMMP, registrar la señal, y a continuación, tras 25 min pasando una corriente seca de N_2 volver a registrar la señal en varios puntos para asegurar la completa desorción. En todos los ciclos se monitorizó la señal del pico a 706 cm^{-1} en la parte superior de la microestructura G1 y en el suelo. La Figura 7.20b muestra como tras 2 ciclos de adsorción/desorción el sustrato G1_Ag_AuNP sigue mostrando el mismo comportamiento sobre la microestructura debido a la interacción reversible entre el citrato y el DMMP.

7.5 CONCLUSIONES

En este capítulo se han desarrollado sustratos SERS basados en microestructuras piramidales. Las micropirámides se fabricaron mediante una combinación de *corner lithography* y ataques anisotrópicos del silicio, y finalmente se recubrieron con una capa fina de plata. Este método de fabricación nos ha permitido preparar sustratos 3D altamente uniformes, homogéneos y reproducibles a escala de oblea.

Las micropirámides de generación G0 y G1 recubiertas únicamente de 40 nm de Ag alcanzaron un factor de aumento de hasta $6,4 \times 10^5$ en G1. Mediante simulación FDTD

de campos eléctricos sobre las microestructuras se observó que el origen de la amplificación la señal son los modos plasmónicos *Edge plasmon polaritons* (EPPs) que se generan sobre las aristas y que permiten que toda la estructura se convierta en un resonador óptico. Por su parte, sobre las caras laterales de la micropirámides se generan modos plasmónicos *breathing modes* que también contribuyen al aumento de la señal, aunque en menor medida.

Además, hemos realizado un estudio combinando las micropirámides G1 y G3 recubiertas con una capa continua de Ag (77 nm) con nanopartículas de oro, alcanzándose una densidad de nanopartículas sobre la estructura de $600 \text{ NP}/\mu\text{m}^2$. Este tándem permitió alcanzar AEF de $3,1 \times 10^7$ y $3,8 \times 10^7$ para las micropirámides G1 y G3, respectivamente. En este caso, el aumento de la señal fue producto de la combinación de tres modos plasmónicos: modos propagantes, acoplamiento partícula-partícula y partícula-capa metálica. Esto son dos órdenes de magnitud más que cuando solo se cubrían las microestructuras con una capa metálica de plata. Además, estas estructuras tridimensionales permiten extender el área activa de adsorción y SERS a las tres dimensiones.

Por su parte, las pirámides G1 recubiertas de Ag se aplicaron a la detección de pesticidas, siendo estas capaces de detectar la huella completa del paraoxon en un rango de concentraciones de 10^{-6} M a 10^{-18} M . La metodología de medida SERS escaneado grandes áreas del sustrato y promediando la señal nos ha permitido obtener valores de RSD menores al 11%, para el rango de concentraciones de paraoxon 10^{-6} M - 10^{-9} M .

En cambio, aprovechando la capa de citrato de las nanopartículas de oro, las micropirámides G1 recubiertas de Ag y AuNP se han destinado a la detección de agentes neurotóxicos en fase gas. Se ha comprobado que son capaces de detectar hasta cuatro picos de la huella de DMMP en una concentración de 1,2 ppmV. La homogeneidad y reproducibilidad de la señal sobre la parte superior de las micropirámides G1 queda corroborada al obtenerse una RSD del 10%, similar a la obtenida con las G1 en la detección de pesticidas. La interacción reversible citrato-DMMP ha permitido realizar ciclos de adsorción/desorción del analito obteniéndose una RSD de la señal del 5%.

En resumen, la principal ventaja de estos sustratos sería la amplificación de la señal que producen por el acoplamiento de diferentes modos plasmónicos sobre su superficie. Esta cualidad les permite detectar bajas concentraciones de paraoxon en fase líquida y

DMMP en fase gas. Una posible desventaja de estos sustratos SERS sería su coste de fabricación debido a la necesidad de trabajar en sala blanca, aunque hay que recordar que se fabrican a escala de oblea.

Capítulo VIII

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS PLATAFORMAS SERS DESARROLLADAS PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

Resumen

En este capítulo se presenta un resumen comparativo de las plataformas SERS desarrolladas durante esta tesis para la detección de agentes neurotóxicos en fase gas y pesticidas en fase líquida. Posteriormente, las plataformas se comparan con otros sensores SERS reportados en literatura para la detección de analitos en fase gas y líquida, y finalmente, se comparan con los niveles de exposición máxima establecidos por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA) y la Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA).

8 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS PLATAFORMAS SERS DESARROLLADAS PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

8.1 DETECCIÓN DE AGENTES NEUROTÓXICOS EN FASE GAS

8.1.1 Comparación entre los diferentes sustratos SERS desarrollados

Los sustratos SERS tienen que cumplir una serie de requisitos para poder convertirse en una potente herramienta analítica en la detección e identificación de compuestos químicos [51,194], entre ellos, alta selectividad y sensibilidad, fiabilidad y robustez para evitar falsos positivos o falsos negativos, estabilidad. Además, en el caso de detección de agentes altamente tóxicos en fase gas siempre se buscan tiempos de respuesta cortos y la posibilidad de trabajar con equipos portables para poder alertar a la población rápidamente y mejorar la operabilidad de los equipos de rescate (ver Figura 1.1, pág. 4). Basándonos en estos criterios hemos ido desarrollando y caracterizando nuestras plataformas SERS que aparecen resumidas en la Tabla 8.1.

El mejor Factor de Aumento Analítico (AEF), de entre los medidos, lo hemos obtenido con los Ag nplates@grafito, $1,3 \times 10^8$, porque conjuga la plata con una morfología que es capaz de confinar los campos eléctricos sobre sus vértices [11,28,80,81]. También el protocolo de preparación del recubrimiento sobre el soporte, así como, la uniformidad de este, juegan un papel importante en el AEF. En todos los casos hemos desarrollado protocolos reproducibles donde hemos alcanzado espaciados entre nanopartículas de hasta 5 nm, donde se puede producir un acoplamiento de los modos plasmónicos de partículas contiguas [35,274,335,428].

Aunque el material plasmónico y la morfología de la nanopartícula juegan un papel importante en el efecto SERS, al tratarse de un analito gaseoso lo que define las capacidades de detección del sensor SERS es el tipo de interacción entre el analito y el material plasmónico. De este modo, hemos clasificado las plataformas en tres grupos: interacción directa, interacción a través de ligandos o adsorción en material poroso.

Tabla 8.1 Resumen de las principales propiedades de las plataformas SERS desarrolladas durante esta tesis doctoral para la detección de DMMP en fase vapor. En negrita el mejor resultado para cada característica.

Propiedades	Plataforma SERS				
	Ag nplates @grafito	AuNP@citrato	G1_Ag_AuNP	Au@MCM	Au@Ag@ZIF8
Metal Plasmónico	Ag	Au	Ag y Au	Au	Au y Ag
Morfología	Nanotriángulos	Nanoesferas recubiertas de citrato	Micropirámides recubiertas de una capa fina de Ag y AuNP	AuNP sobre un núcleo de MCM48	Rods concéntricos recubiertos de ZIF8
AEF	1,3 × 10⁸	9,2 × 10 ⁶	3,8 × 10 ⁷	1,1 × 10 ⁷	N.D.
Propiedades de detección					
Vía de anclaje del analito	Interacción directa con la Ag	Interacción débil con el citrato	Interacción débil con el citrato	Adsorción en material poroso	Adsorción en material poroso
Sensibilidad*	2500 ppbV	625 ppbV (LOD = 130 ppbV)	2500 ppbV	50 ppbV	DMMP: 50 ppbV (LOD = 6 ppbV) CEES: 76 ppbV
σ **, ruido de fondo	0,16 ± 0,06	0,18 ± 0,12	0,17 ± 0,12	0,08 ± 0,03	0,13 ± 0,06
Reciclabilidad	No	Si, N ₂ - 25 min	Si, N ₂ - 25 min	Si, 200°C - 12h	Si, 200°C - 2h
Concentración del analito	No	Baja	Baja	Alta	Alta
Caracterización con el equipo Raman Portable					
Homogeneidad de la señal, RSD	5%	5% ***	10% ***	9%	DMMP: 13% CEES: 22%
Tiempo de respuesta (t _{50%})	137 s	100 s ***	N.D.	120 s	DMMP: 21 s CEES: 54 s
Proceso de fabricación					
Complejidad	Baja	Baja	Alta	Media	Media
Escalabilidad	Media	Media	Alta	Baja	Media
Coste	€	€	€€	€	€
Referencia	Capítulo 3	Capítulo 4	Capítulo 7	Capítulo 5	Capítulo 5

*La sensibilidad hace referencia a la concentración más baja medida experimentalmente.
 **Calculado tras normalizar la señal al pico del DMMP desplazado a ~710 cm⁻¹. N > 250 puntos.
 *** Valores obtenidos con el equipo Raman de sobremesa.
 AEF: Factor de Aumento Analítico.
 LOD = límite de detección teórico.
 N.C.: no calculado.

El tipo de interacción está muy ligado con la selectividad del sensor, y el número de bandas de la huella dactilar que se pueden llegar a identificar. En la Figura 8.1 podemos observar los espectros de DMMP, 2500 ppbV, recogidos sobre cada una de las cinco

plataformas. Los espectros SERS han sido normalizados al pico desplazado a 710 cm^{-1} , banda *c*, y correspondiente al modo vibracional P-C stretching del DMMP. Las plataformas que utilizan el citrato para anclar al DMMP cerca del metal, AuNP@citrato y G1_Ag_AuNP, presentan un espectro más ruidoso y con interferencias de las bandas pertenecientes al citrato. Esto hace que la ventana espectral se reduzca y no podamos identificar con tanta claridad los picos correspondientes al DMMP. Por su parte, la plataforma Ag nPlates@grafito con una interacción directa entre Ag — DMMP nos permite observar hasta cuatro picos de DMMP con la menor relación señal ruido, debido a que el DMMP se encuentra unido al metal plasmónico. La plataforma Au@MCM presenta la huella dactilar más clara y con mayor número de bandas, esto se puede atribuir a la capacidad de concentración del DMMP en el interior del material poroso y junto a las AuNP, que se encuentran en el exterior de las esferas de MCM-48. Podemos decir que estas esferas mesoporosas actúan como una esponja para la adsorción del DMMP. Además, al tratarse de SiO_2 sólo aparece una banda característica del material adsorbente en torno a 460 cm^{-1} , que no interfiere con ninguna de las bandas del DMMP. En el caso de la plataforma Au@Ag@ZIF8, hay mayor cantidad de picos correspondientes al material microporoso, no obstante, también se consigue un efecto de preconcentración, alcanzado la misma sensibilidad experimental que con la MCM48, 50 ppbV para el DMMP y además se llegaron a medir 76 ppbV de CEES con el equipo portable.

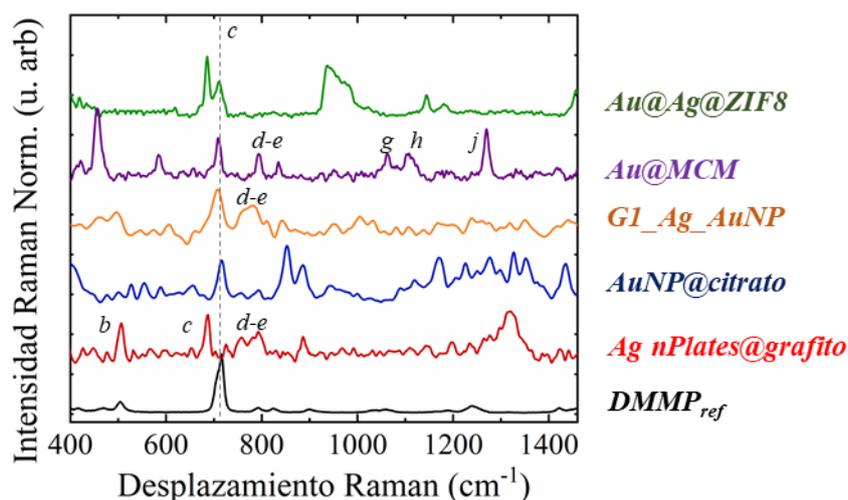


Figura 8.1 Caracterización con el equipo Raman de sobremesa: espectro SERS promedio del DMMP (2500 ppbV) recogido sobre las diferentes plataformas SERS estudiadas comparado con el espectro Raman del DMMP puro. $N = 20$. Los espectros se han normalizado respecto al pico desplazado a $\sim 710\text{ cm}^{-1}$, banda *c*, PC *stretching* del DMMP, y se han desplazado en el eje-y para una mejor comparación. Para más información sobre la asignación de picos ver Tabla 2.5 (pág. 55).

Un parámetro clave en la detección temprana de agentes tóxicos en fase gas es el tiempo de respuesta de la plataforma. Los mejores tiempos de respuesta se han obtenido con la plataforma Au@Ag@ZIF8, 21 s para DMMP y 54 s en la detección de CEES. Esta plataforma también ha ofrecido el espectro con menor señal ruido.

Otra característica ligada directamente al tipo de interacción es la reciclabilidad o capacidad de reutilización del sustrato. Los sustratos estudiados abarcan desde la interacción directa e irreversible entre Ag-DMMP, pasando por a la adsorción reversible en los materiales porosos, donde la regeneración es posible aplicando calor de, hasta la interacción débil citrato-DMMP que puede invertirse pasando una corriente seca de N₂.

Otros parámetros importantes a la hora de seleccionar una plataforma SERS son la homogeneidad de la señal y el protocolo de fabricación. El primero puede estimarse a través de la RSD de la señal donde, en general, hemos alcanzado RSD < 20% y del 5% para los Ag nPlates@grafito. En todos los casos N ≥ 3 sustratos. El protocolo de fabricación lo hemos dividido en tres subcategorías: complejidad, escalabilidad y coste. En este caso la mayor complejidad, pero a la vez la mayor escalabilidad la presenta la plataforma preparada mediante *top-down*, las micropirámides G1_Ag_AuNP. Aunque al necesitarse tecnología de sala blanca también tendría el coste más elevado. Por otro lado, las plataformas que usan nanopartículas coloidales presentan la menor complejidad. Finalmente, las nanopartículas *core-shell* tienen una escalabilidad entre media y baja, puesto que el rendimiento de Au@MCM es bajo.

Todos estos resultados nos indican que las plataformas que presentan las propiedades más adecuadas para la detección de agentes tóxicos en fase vapor son las nanopartículas plasmónicas combinadas con adsorbentes, Au@Ag@ZIF8 y Au@MCM. Estas unifican la concentración del analito en los poros del ZIF8 y MCM48, respectivamente, aumentando así la sensibilidad, con un tiempo rápido de respuesta, especialmente Au@Ag@ZIF8 con $t_{50\%} < 54$ s.

8.1.2 Estado del arte y comparación de sustratos SERS para detección en fase gas

Los trabajos para la detección de agentes tóxicos a bajas concentraciones en fase gas en la literatura abierta son escasos. Además, en ocasiones la comparación puede resultar complicada porque no se aporta la concentración de analito alimentada o los tiempos de respuesta no han sido medidos. Los resultados más relevantes en la detección de analitos

en fase gas a bajas concentraciones, utilizando la tecnología SERS se muestran en la Tabla 8.2. Las plataformas se encuentran divididas en grupos según el tipo de interacción con el analito, y dentro del grupo en orden creciente de sensibilidad.

Tabla 8.2 Resumen de lo publicado hasta el momento en detección SERS de diferentes moléculas en fase gas en concentraciones inferiores a 10 ppmV.

Material plasmónico	Analito	Vía de anclaje	Equipo Raman	Sensibilidad* (ppbV)	Tiempo respuesta
Interacción débil					
Ag nRods [269]	Benceno	Van der Waals con propentiol	Portable	10.000	120 s
Interacción directa					
AgFON, 200 nm de Ag sobre NPs [218]	Bencenotiol (BT)	A través del S – Ag	Portable	8.000	50-100 s
nPilares recubiertos de Au [209]	Cianuro de hidrógeno (HCN)	HCN – Au	Sobremesa	5.000	15 min**
nHilos de Au/Ag [248]	NO ₂	A través del O – Au	Portable	100	3 min
Ag nRods recubiertos de HfO ₂ [443]	2-naftalenotiol (2-NAT)	A través del S – OHf	Portable	20	40 min**
Adsorción en material poroso					
NPs de Au recubiertas de sílica [265]	2,4-dinitrotolueno (DNT)	Adsorción en los poros	Portable	100	3 min
nCubos de Ag recubiertos de capa de ZIF8 [178]	2-naftalenotiol (2-NAT)	Adsorción en los poros de ZIF8	Sobremesa	50	15 min**
nCubos de Ag recubiertos de capa de ZIF8 [366]	4-metil bencenotiol (4-MBT)	Adsorción en los poros de ZIF8	Portable y a 2 m de distancia	50	30 s
Detección indirecta del analito					
nHilos de Ag recubiertos de hidróxido de Co-Ni [446]	Varios aldehído	Reacción química con p-aminotiofenol	Sobremesa	10	10 min**
NPs de Au recubiertas de CuO [447]	H ₂ S	Reacción química con CuO	Sobremesa	0,1	25 s

*La sensibilidad hace referencia a la concentración más baja medida experimentalmente.

**Tiempo de incubación del sustrato con el analito. No especifican tiempos de respuesta midiendo en continuo.

En general, los mejores resultados se han obtenido en las plataformas que utilizan materiales porosos. El caso más similar a nuestra plataforma Au@Ag@ZIF8 serían unos nanocubos de Ag depositados por Langmuir-Blodgett sobre los que se crece una capa de ZIF-8 de 146 nm [178,366]. La sensibilidad de la plataforma es de 50 ppbV en la detección de 4-metilbencenotiol (4-MBT) y con un tiempo de respuesta de 30 s. La principal diferencia con nuestra plataforma es el analito, en su caso usan el 4-MBT. El 4-MBT posee anillo bencénico, y una mayor *cross-section*, lo que en general, permite que las intensidades SERS, y, por tanto, la sensibilidad en la detección sea mayor que con moléculas pequeñas como DMMP o CEES. También hay que destacar la plataforma formada por nanohilos de Au y Ag que mediante interacción directa con el Au ha sido capaz de detectar 100 ppbV de NO₂ en menos de 3 min [248]. Unos resultados excepcionales puesto que es una molécula pequeña. Siguiendo esta misma línea, nanorods de oro recubiertos de óxido de hafnio IV (HfO₂) han detectado 20 ppbV de 2-naftalenodiol tras un tiempo de incubación de 40 min [443].

De entre todos los analitos de la Tabla 8.2, el cianuro de hidrógeno (HCN) es el único agente de guerra químico, en particular es un agente sanguíneo [444], y mediante su interacción directa con el oro se han llegado a detectar 5 ppmV [445]. Su toxicidad se debe al ion cianuro CN⁻, que inhibe la respiración celular. Este compuesto es trágicamente famoso porque fue utilizado por la Alemania nazi durante la Segunda Guerra Mundial en las cámaras de gas de los campos de exterminio. En la actualidad su detección a bajas concentraciones tiene como objetivo la detección precoz de ciertas enfermedades respiratorias como la fibrosis quística [209,445].

Finalmente, se están obteniendo resultados muy prometedores, en la detección SERS en fase gas, a través de la detección indirecta del analito. En estos casos, el analito reacciona irreversiblemente con el recubrimiento de las nanopartículas plasmónicas, y es la huella dactilar del producto la que se monitoriza. Esta técnica se ha utilizado para detectar diferentes aldehídos a través de su reacción con el p-aminotiofenol con el que previamente se había funcionalizado el metal plasmónico, nanohilos de plata, alcanzándose una sensibilidad de 10 ppbV [446]. Siguiendo el mismo mecanismo se han llegado a detectar 0,1 ppbV de H₂S tras reaccionar con una capa de CuO [447]. Ambos estudios se han realizado con equipos Raman de sobremesa que ofrecen una mayor resolución.

Tras analizar todas estas plataformas podemos considerar que nuestras plataformas SERS se encuentran a la vanguardia del sector. Los tiempos de respuesta en nuestro caso son siempre inferiores a 137 s, y hasta de 21 s para Au@Ag@ZIF8. Asimismo, esta plataforma ha sido capaz de detectar 50 ppbV de DMMP, al igual que Au@MCM, y 76 ppbV de CEES. Por otro lado, la plataforma AuNP@citrato presenta una alta reciclabilidad y estabilidad de hasta 10 ciclos con una alta sensibilidad. La ventaja de Ag nPlates@grafito es la alta amplificación de su señal y que están depositados sobre un soporte barato y flexible como es el grafito.

La aplicación final de las plataformas SERS desarrolladas es la detección temprana de agentes neurotóxicos en fase gas. Los valores de sensibilidad y tiempo de respuesta de la plataforma se deben comparar con los Niveles de Exposición Aguda (AEGLs) descritos por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA, *US Environmental Protection Agency*) para los gases reales sarín [448] y mostaza [449]. Los AEGLs describen los efectos que tiene para la salud humana la exposición puntual a los vapores de compuestos químicos y se utilizan para diseñar planes de emergencia y evacuación. Los AEGLs están calculados para cinco periodos cortos de exposición y están divididos en tres grupos según la agresividad de los efectos en la salud (Tabla 8.3).

Tabla 8.3 AEGLs para los gases tóxicos sarín y mostaza [448,449].

AEGL	Tiempo de exposición				
	10 min	30 min	60 min	4 h	8 h
Gas Sarín (Agente GB) - ppbV [mg/m³]					
AEGL1	1,2 [0,0069]	0,68 [0,0040]	0,48 [0,0028]	0,24 [0,0014]	0,17 [0,0010]
AEGL2	15 [0,087]	8,5 [0,050]	6,0 [0,035]	2,9 [0,017]	2,2 [0,013]
AEGL3	64 [0,38]	32 [0,19]	22 [0,13]	12 [0,070]	8,7 [0,051]
Gas Mostaza - ppbV [mg/m³]					
AEGL1	60 [0,40]	20 [0,13]	10 [0,067]	3,0 [0,017]	1,0 [0,0083]
AEGL2	90 [0,60]	30 [0,20]	20 [0,10]	4,0 [0,025]	2,0 [0,013]
AEGL3	590 [3,9]	410 [2,7]	320 [2,1]	80 [0,53]	40 [0,27]

El AGL3 es el nivel más alto de toxicidad y estar expuesto a sus valores máximos de concentraciones por tiempo superior al fijado puede provocar efectos potencialmente

mortales o causar la muerte. La exposición a niveles de AEGL2 tienen efectos adversos, irreversibles y duraderos para la salud humana. Y los rangos de AEGL1 provocan malestar, irritación o asintomáticos a nivel sensorial. En este caso, los efectos son transitorios y reversibles al cesar la exposición.

Teniendo en cuenta que la respuesta con el equipo Raman de sobremesa y el portable es prácticamente idéntica para el DMMP, podemos considerar que seríamos capaces de detectar, 50 ppbV en 21 s con la plataforma Au@Ag@ZIF8. Este valor de concentración se encuentra entre los AEGL2 y AEGL3 para 10 min del gas sarín, 15 y 64 ppbV, respectivamente. Lo que nos ofrecería más de 9 min para evacuar el espacio donde se hubiera liberado el gas tóxico sarín antes de que tuviera efectos irreversibles para la salud. En el caso del CEES, somos capaces de detectar 76 ppbV en 54 s. Este valor se encuentra entre los niveles menos agresivos, AEGL1 y AEGL2, para 10 min de exposición del gas mostaza, que son 60 y 90 ppbV, respectivamente. Un resultado excelente que nos permitiría tener más de 10 min para evacuar antes de que comenzaran a sentirse los primeros efectos sobre la salud.

8.2 DETECCIÓN DE PESTICIDAS EN FASE LÍQUIDA

8.2.1 Comparación entre los diferentes sustratos SERS desarrollados

La Tabla 8.4 resume las características principales de las tres plataformas SERS desarrolladas para la detección de paraoxon. Se han ordenado según el tipo de interacción entre el analito y material plasmónico: interacción directa o interacción electrostática.

En un sustrato hemos utilizado una capa de plata evaporada sobre micropirámides como metal plasmónico, G1_Ag, mientras que en las otras dos plataformas SERS han sido nanopartículas de oro esféricas, AuNP@PMo y AuNP@PW. El mejor Factor de Aumento Analítico (AEF) lo hemos obtenido con las AuNP@PW, $3,1 \times 10^7$, porque conjuga los dos efectos que originan la amplificación SERS: el efecto electromagnético y el efecto químico. El primero está proporcionado por el Au y el espaciado entre las AuNP y el segundo por la transferencia de carga entre Au – PW – analito.

La interacción directa Ag – paraoxon de la plataforma G1_Ag ha permitido la identificación de hasta 10 modos vibracionales del paraoxon (Figura 8.2). Sin embargo, las plataformas AuNP@PMo y AuNP@PW que utilizan la interacción electrostática

entre el POM y el paraoxon solo han podido identificar cuatro picos, puesto que el resto de la ventana espectral coincide con las bandas del PMo y PW (Figura 8.2).

Tabla 8.4 Resumen de las plataformas SERS desarrolladas durante esta tesis doctoral para la detección de paraoxon. En negrita el mejor resultado para cada propiedad.

Propiedades	Plataforma SERS		
	G1_Ag	AuNP@PMo	AuNP@PW
Material Plasmónico	Ag	Au	Au
Morfología	Micropirámides recubiertas de una capa fina de Ag	NPs esféricas recubiertas del polioxometalato PMo	NPs esféricas recubiertas del polioxometalato PW
AEF	$1,7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$
Propiedades de detección			
Via de anclaje del analito	Interacción directa con Ag	Interacción electrostática con el PMo	Interacción electrostática con el PW
Sensibilidad*	10^{-18} M (2×10^{-10} µg/L)	10^{-6} M (247 µg/L)	10^{-6} M (247 µg/L)
σ^{**} , ruido de fondo	$0,059 \pm 0,024$	$0,099 \pm 0,045$	$0,064 \pm 0,045$
Homogeneidad de la señal, RSD	25%	5%	27%
Reciclabilidad	N.C.	Si, pasando H ₂ O limpia	Si, pasando H ₂ O limpia
Extras	-	Medidas en continuo en una celda de microfluídica de PDMS	Medidas en continuo en una celda de microfluídica de PDMS
Proceso de fabricación			
Complejidad	Alta	Baja	Baja
Escalabilidad	Alta	Alta	Alta
Coste	€€	€	€
Referencia	Capítulo 7	Capítulo 4	Capítulo 4

*La sensibilidad hace referencia a la concentración más baja medida experimentalmente.

**Calculado tras normalizar la señal al pico del paraoxon desplazado a ~ 1346 cm^{-1} con $N > 250$ puntos.

AEF: Factor de Aumento Analítico.

N.C.: no calculado.

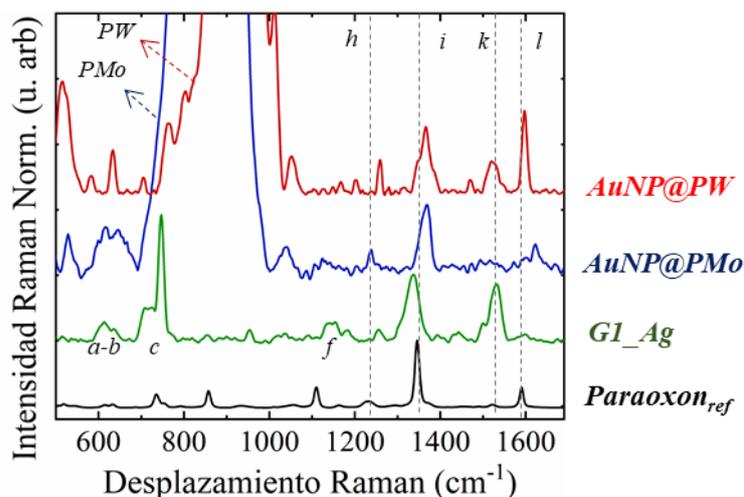


Figura 8.2 Espectro SERS promedio del paraoxon ($1 \mu\text{M}$) recogido sobre las diferentes plataformas SERS estudiadas comparado con el espectro Raman del paraoxon puro. $N = 100$. Los espectros se han normalizado respecto al pico desplazado a $\sim 1346 \text{ cm}^{-1}$, banda *i*, NO_2 *stretching simétrico* del paraoxon, y se han desplazado en el eje-y para una mejor comparación. Para más información sobre la asignación de picos ver Tabla 2.9 (pág. 65).

El tipo de interacción también afecta al desplazamiento de las bandas principales puesto que la orientación de la molécula no será la misma [61–63]. Por ejemplo, si nos fijamos en la banda principal, banda *i* en la Figura 8.2, podemos observar que cuando la interacción es fuerte y directa con la Ag el pico se desplaza a menores frecuencias. Este efecto también puede observarse con el DMMP, Figura 8.1. En cambio, cuando la interacción es más débil, interacción electrostática, las bandas se desplazan hacia mayores frecuencias.

La plataforma G1_Ag alcanzó una sensibilidad en la detección de paraoxon de 10^{-18} M . El origen principal de dicha amplificación es la adsorción selectiva del analito sobre las aristas de la micropirámide debido a los defectos de grano producidos durante la evaporación de la Ag. Ya que es sobre estas aristas donde se localiza la mayor amplificación de la señal producida por los plasmones de superficie *Edge Plasmon Polaritons* (EPPs). Además, la interacción fuerte y el bajo ruido de fondo permitieron que se pudiera detectar la huella completa hasta 10^{-18} M .

Una gran ventaja de las plataformas AuNP@PMo y AuNP@PW es que están fabricadas directamente sobre un dispositivo de microfluídica que permite la monitorización continua del analito. Además, la síntesis de las nanopartículas y su recubrimiento con el POM se realiza en un solo paso y directamente sobre la paredes del microdispositivo de PDMS. Esto se traduce en un protocolo de fabricación sencillo,

escalable y de bajo coste. Al contrario que la preparación de G1_Ag que es costosa y más compleja.

8.2.2 Estado del arte y comparación de sustratos SERS para detección en fase líquida

En la Tabla 8.5 se muestran las plataformas SERS que mayores sensibilidades han demostrado en la detección de pesticidas, herbicidas y fungicidas en fase líquida. Las plataformas se encuentran divididas en grupos según el tipo de interacción con el analito, y dentro del grupo en orden creciente de sensibilidad.

Todos los tipos de interacción han demostrado ser adecuados para la detección de compuestos organofosforados, sulfurados y clorados en fase líquida. Mediante interacciones π - π entre el polímero anfifílico que recubre los nCubos de Au se han alcanzado sensibilidades de 10^{-12} M para el insecticida organofosforado clorpirifós [450].

La interacción directa entre el metal plasmónico y el analito ha permitido detectar 5×10^{-11} M del fungicida Thiram [251] y hasta 10^{-18} M de bencenotiol (BT) [451]. Este último utilizando estructuras 3D con forma de panal de abejas formadas por el ensamblaje de NPs de Au con la misma morfología. La alta sensibilidad se debe a la adsorción selectiva del BT en las cavidades/poros de las nanopartículas donde el acoplamiento electromagnético es máximo [451]. Este estudio está en la misma línea de los resultados obtenidos con la plataforma G1_Ag, donde gracias a la adsorción preferencial del paraoxon en las aristas de las micropirámides hemos sido capaces de detectar 10^{-18} M de paraoxon.

Las plataformas que usan materiales mesoporosos han alcanzado mejores sensibilidades que las que usan microporosos, hasta de 10^{-18} M para el fungicida tiabendazol (TBZ) [266], debido al tamaño de los pesticidas. Por su parte, los mejores resultados de detección de paraoxon se han alcanzado utilizando la detección indirecta, es decir, detectando el producto de la reacción con la enzima acetilcolinesterasa, 4×10^{-15} M [246]. Sensibilidad tres órdenes de magnitud inferior a la alcanzada con G1_Ag.

Tabla 8.5 Resumen de lo publicado hasta el momento en detección SERS de diferentes pesticidas, herbicidas y fungicidas en concentraciones inferiores a 10^{-7} M.

Material plasmónico	Analito	Clase	Vía de anclaje del analito	Sensibilidad*
Interacción débil				
“Superpartícula” cúbica formada por nCubos de Ag [450]	Clorpirifós (CPZ)	Insecticida organofosforado	Interacción π - π con amPEN**	10^{-12} M (350 pg/L)
Interacción directa				
Cavidades triangulares recubiertas de Ag [452]	Alacloro	Herbicida clorado	Ag – alacloro	$1,5 \times 10^{-9}$ M (400 ng/L)
NPs de Au recubiertas de Ag [249]	Paraoxon	Pesticida organofosforado	Ag – paraoxon	10^{-9} M (247 ng/L)
nPilares con Au en la parte superior [250]	Clorpirifós (CPZ)	Insecticida organofosforado	Au – Clorpirifós	$9,9 \times 10^{-11}$ M (35 ng/L)
NPs Au y Ag sobre NPs Fe_3O_4 - SiO_2 [251]	Thiram	Fungicida sulfurado	Ag – Thiram	5×10^{-11} M (12 ng/L)
“Superestructuras huecas” formadas por NPs de Au octogonales [451]	Bencenotiol (BT)	No clasificado ***	Au – BT	10^{-18} M (0,11 fg/L)
Adsorción en material poroso				
nHilos de Ag recubiertos de cristales de ZIF8 [387]	Thiram	Fungicida sulfurado	Adsorción en los poros	1×10^{-7} M (24 μ g/L)
NPs de Au recubiertas de SiO_2 mesoporosa [453]	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	Herbicida clorado	Adsorción en los poros	4×10^{-9} M (1 ng/L)
NPs de Au embebidas en n NPs de SiO_2 [266]	Tiabendazol (TBZ)	Fungicida sulfurado	Adsorción en los poros	10^{-18} M (0,20 fg/L)
Detección indirecta				
NPs de Au [246]	Paraoxon	Insecticida organofosforado	Reacción enzimática con la acetilcolinesterasa	4×10^{-15} M (0,98 pg/L)

*La sensibilidad hace referencia a la concentración más baja medida experimentalmente.

***amPEM: copolímero anfífilico de poliarileno éter nitrilo

*** Este analito no es pesticida ni herbicida.

Hay que destacar que todos los resultados mostrados se refieren a una detección “estática”, es decir, depositando una gota de la disolución del analito sobre el sustrato, dejarla secar, y medir, procedimiento seguido en G1_Ag. Cuando la monitorización se hace en continuo la sensibilidad disminuye. Así se han reportado microdispositivos de silicio en el que por remplazamiento galvánico se han crecido nanopartículas de Ag que por interacción directa han sido capaces de detectar $2,2 \times 10^{-8}$ M ($2,2 \mu\text{g/L}$) del pesticida carbofurano y $1,8 \times 10^{-8}$ M ($1,8 \mu\text{g/L}$) de alacloro tras 20 min alimentándolos al dispositivo [454]. Por otro lado, nanopartículas de oro depositadas sobre ZnO y nanorods de oro han sido embebidos dentro de un polímero termosensible (pNIPAM) y depositados dentro de capilares. Cuando el sistema se calienta, el polímero se dilata adsorbiendo las moléculas de metil paratión en su interior y cerca de los metales plasmónicos alcanzándose una sensibilidad de 1×10^{-7} M ($29 \mu\text{g/L}$) [455]. Estos límites de detección están en el orden de los alcanzados por las plataformas AuNP@PMo y AuNP@PW, $52,1 \mu\text{g/L}$ y $41,4 \mu\text{g/L}$, respectivamente.

Por último, si nos comparamos con las necesidades de la aplicación, tenemos que recordar que el paraoxon es el metabolito activo del insecticida paratión y debido a su alta toxicidad, su uso está prohibido por la Unión Europea desde 2003 [19]. Por lo que su detección a bajas concentraciones resulta primordial para detectar posibles delitos contra el medioambiente o la salud.

Capítulo IX

CONCLUSIONES GENERALES / GENERAL CONCLUSIONS

9 CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo principal de esta tesis ha sido el desarrollo de sustratos SERS para la detección e identificación de compuestos organofosforados a bajas concentraciones, en fase gas y líquida. Los resultados obtenidos y la interpretación de los mismos nos han llevado a las siguientes conclusiones:

- Las nanotriángulos de plata producen la mayor amplificación del campo eléctrico, es decir, los mayores aumentos de la señal Raman. Además, soportarlos sobre grafito permite disminuir la fluorescencia de la señal en las longitudes de onda de excitación de 532, 633 y 785 nm mediante procesos de transferencia de carga y energía. La interacción directa del DMMP con la plata a través de los tres oxígenos PO₃ permite identificar cuatro bandas del DMMP con una baja señal-ruido. La principal desventaja de sensores basados en plata son su baja estabilidad temporal y que la interacción DMMP-Ag es irreversible.
- La deposición de la nanopartículas coloidales sobre soportes sólidos mediante interacciones electrostáticas permite preparar sustratos SERS uniformes, RSD < 15%, y con distancias entre partículas menores a 10 nm a las que se produce el acoplamiento de los plasmones de resonancia.
- La síntesis de nanopartículas de oro recubiertas de polioxometalatos, POMs, bajo luz UV está favorecida por la nucleación preferencial del Au⁰ sobre la superficie del PDMS y asistida por los POMs. Esto permite sintetizarlas y depositarlas en una sola etapa en el interior de microdispositivos compactos de PDMS.
- Las interacciones débiles entre el DMMP y los ligandos de afinidad permiten conseguir sensores reciclables como demuestran las plataformas basadas en nanopartículas de oro estabilizadas con citrato o polioxometalatos, POMs. El DMMP interacciona con los iones citrato que recubren a las nanopartículas de oro a través de puentes de hidrógeno. Los POMs interaccionan con el paraoxon mediante interacciones π - π . Además, el dispositivo AuNP@PW alcanza mayores amplificaciones de la señal que el AuNP@PMo debido a una interacción fuerte e irreversible entre el analito y el *shell* de PW que favorece la transferencia de carga entre la nanopartícula de oro y el analito.
- Las plataformas SERS basadas en nanopartículas *core-shell* combinan las propiedades plasmónicas de las nanopartículas de oro con las propiedades

adsorbentes y de preconcentración del analito de los materiales meso- y microporosos, MCM48 y ZIF8. Estas alcanzan los menores límites de detección, 50 ppbV de DMMP y 76 ppbV de CEES, tiempos de respuesta < 120 s, y se regeneran tras calentarlas a 200°C. Además, la homogeneidad de las nanopartículas *core-shell* permite que la señal del material poroso se utilice como patrón interno.

- La morfología y propiedades de las nanoestructuras ordenadas de oro, preparadas por procesos *top-down*, son fácilmente modificables variando la profundidad de la cavidad de silicio y el espesor de la capa de oro evaporada. En ambas estructuras, simétricas y no simétricas, la mayor intensificación del campo eléctrico se produce en el espaciado superior entre nanoestructuras y aumenta al disminuir el tamaño de este espaciado debido al acoplamiento de los plasmones de nanoestructuras adyacentes. Además, las nanoestructuras no-simétricas de mayor tamaño se comportan como una antena óptica amplificando la señal. Estos resultados han sido predichos mediante simulaciones FDTD y validados experimentalmente.
- Se ha encontrado mediante simulaciones FDTD que las micropirámides de generación G0 y G1 recubiertas de plata pueden soportar modos plasmónicos de superficie *Edge Plasmon polaritons* (EPPs) y *breathing modes* permitiendo que la estructura se comporte como un resonador óptico. Con estas estructuras se ha podido detectar hasta 10^{-18} M de paraoxon. Al depositar nanopartículas de oro sobre las micropirámides la señal SERS es producto de la combinación de tres modos plasmónicos: modos propagantes, acoplamiento partícula-partícula y partícula-capa metálica, lo que aumenta la señal en dos órdenes de magnitud. Además, estas estructuras tridimensionales permiten extender el área activa de adsorción y SERS a las tres dimensiones.

GENERAL CONCLUSIONS

The main objective of this thesis was the development of SERS substrates for the detection and identification of organophosphorous compounds at low concentrations in gas and liquid phase. The results obtained and their interpretation brought us to draw the following conclusions:

- Silver nanoplates produce the higher enhancement of the electric field, in other words, the highest Raman signals. Furthermore, the deposition of them onto graphite allows to quench fluorescence signal due to non-radiative interactions. The direct interaction between DMMP with silver, through the three oxygens of PO_3 group, allows to identify four vibrational bands of DMMP. The drawbacks of this SERS platforms based on silver is their poor stability and the irreversibility of DMMP-Ag interaction.
- Deposition of colloidal nanoparticles onto solid supports, by means of electrostatic interactions, allows to prepare uniform SERS substates, $\text{RSD} < 15\%$, and spacings between nanoparticles lower than 10 nm where coupling of plasmon resonances occurs.
- The direct UV-photosynthesis of gold nanoparticles coated with polyoxometalates, POMs, is promoted by the preferential nucleation of Au^0 on the PDMS surface aided by the POMs. This procedure allows to synthesize and deposit the nanoparticles in one single step inside the PDMS microchannels.
- The weak interaction between DMMP and affinity agents allows to reach recyclable sensors. DMMP interacts with citrate ions via hydrogen bonding. POMs trap paraoxon-methyl molecules through π - π interactions. In addition, the AuNP@PW dispositive reaches higher SERS signals than AuNP@PMo dispositive due to a strong and irreversible interaction between PW and paraoxon. This interaction is boosted by charge transfer between the gold nanoparticles and analyte.
- SERS platforms based on core-shell nanoparticles combines plasmonic properties of gold nanoparticles with sorbent and preconcentration capacities of micro- and mesoporous materials, MCM48 and ZIF8. These platforms achieve the lowest limit of detection, 50 ppbV of DMMP and 76 ppbV of CEES, the faster response time < 120 s, and could be reusables after heating at 200°C . In addition, the homogeneity

of the core-shell nanoparticles allows to use the signal from the porous sorbents as internal standards eliminating signal fluctuations.

- The ordered gold nanostructures, surrounding the tip of nano-wedges, are highly tuneable by means of the silicon depth of the rhombic cage and by varying the thickness of the sputtered Au layer. FDTD simulations, validated by experimental results, for symmetric as well as asymmetric Au nanostructures upon predict that the enhanced electric field increases reduction of the gap. In the case of symmetric Au nanogaps, the SERS effects arise mainly at the gap between the Au nanoflaps and for asymmetric Au nanostructures the electric field enhancement is the highest close to the Au nanostructure with the largest cross-sectional size due to the antenna effect.
- It has been founded by FDTD simulations that generation G0 and G1 of micropyramids coated with silver thin film support surface plasmon modes as *Edge Plasmon polaritons* (EPPs) and *breathing modes* allowing the whole microstructure to act as optical resonator able to detect up to 10^{-18} M of paraoxon-methyl. By depositing gold nanoparticles onto the silver micropyramids the SERS signals are product of the combination of three plasmonic modes: surface propagating modes, particle-particle coupling and particle-metal layer which increases the signal by two orders of magnitude.

Anexos

ANEXO I. Equipos y técnicas de caracterización

a. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, de sus siglas en inglés *Transmission electron microscopy*) fue utilizada para analizar la morfología y estructura de las nanopartículas sintetizadas. El TEM es un equipo que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados y parte atraviesan la muestra. Todos ellos son conducidos a unas lentes para formar una imagen final sobre una CCD. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.

El microscopio TEM utilizado fue un TECNAI T20 de FEI Company. El TECNAI T20 tiene una fuente de electrones de filamento LaB₆, capaz de trabajar con voltajes de aceleración entre 80 y 200 kV y una resolución de 0,24 nm.

Los análisis de composición de la muestra se realizaron usando la técnica barrido-transmisión (**STEM**) y el equipo TECNAI F30 de FEI Company, capaz de trabajar entre 200 y 300 kV y con una resolución de 0,19 nm.

Las muestras se prepararon tomando una gota de la solución de nanopartículas, según el caso habrá que diluirlas, y depositándola sobre una rejilla de TEM. La rejilla se deja secar a temperatura ambiente durante 12 horas cubierta por una placa Petri de plástico. Las rejillas usadas fueron rejillas Cu 200 Mesh con capa de Formvar/Carbon.

Los cortes transversales realizados a los dispositivos de PDMS recubiertos de nanopartículas en el capítulo IV se realizaron con el crió-ultramicrotomo EM FC7 de Leica a -120 °C. Los cortes se realizaron sin embutir el dispositivo en resina. Los cortes con un grosor entre 50-70 nm se depositaron sobre una rejilla de Cu 300 Mesh y se observaron al T200 a 200 kV.

Las imágenes obtenidas de TEM fueron tratadas y analizadas con el software *IMAQ Vision Builder* para obtener datos del tamaño promedio de las nanopartículas, utilizándose siempre para este fin las mediciones de al menos 100 partículas ($N > 100$).

b. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, de sus siglas en inglés *Scanning electron microscopy*) fue utilizada para analizar la distribución y la densidad de partículas depositadas sobre los sustratos SERS.

El SEM ofrece un amplio rango de informaciones procedentes de la superficie de la muestra. Su funcionamiento se basa en barrer con un haz de electrones un área de la muestra y en función del detector que seleccionemos obtendremos una determinada información de la superficie esta.

- Detector de electrones secundarios (SE) ofrece imágenes en blanco y negro de la topografía de la superficie examinada. Es la señal que ofrece mayor resolución.
- Detector de retrodispersados (BSE) ofrece una imagen de la superficie, pero de menor resolución. Su ventaja consiste en que es sensible a las variaciones en el número atómico de los elementos presentes en la superficie.
- Detector de rayos X (EDS) recibe los rayos X procedentes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. Como la energía de rayos X es característica de cada elemento podemos obtener información analítica cualitativa y cuantitativamente de las áreas que analizamos.

El microscopio SEM utilizado fue un SEM-FEG INSPECT F50, de FEI Company. Este equipo está acoplado a los tres detectores anteriormente descritos. En general, las imágenes SEM de esta tesis se tomaron a un voltaje de 20 kV y un *spot size* de 3.5.

En general, las muestras no requirieron de ninguna preparación previa, solo se les hizo un puente de carbono de unión con el *holder* del SEM para disipar los electrones y que no se acumulen en la superficie, puesto que muchos de los soportes SERS no son conductores. Este puente nos permite obtener imágenes más nítidas y con mayor resolución. En el caso particular de la observación de los microdispositivos poliméricos, estos se recubrieron con 20 nm de carbono, previamente a su introducción en el microscopio. La metalizadora utilizada fue una Leica EM ACE200.

Las imágenes obtenidas de SEM fueron tratadas y analizadas con el software *Image J* para obtener datos de la densidad de nanopartículas sobre la superficie, utilizándose siempre para este fin datos de al menos cinco imágenes SEM.

c. Dual Beam SEM-FIB

El microscopio de doble haz integra las prestaciones de un microscopio electrónico de barrido de emisión (FESEM) con un microscopio de iones de Galio focalizados (FIB). Un FIB es muy similar a un SEM, sin embargo, en lugar de electrones utiliza un haz de iones de Ga^+ . Los iones Ga^+ son más pesados que los electrones por lo que interactúan más fuertemente con la muestra, pero con una penetración menor.

Este equipo se utilizó para preparar muestras ultrafinas o lamelas para TEM de la sección transversal de las estructuras 3D utilizadas como sustratos SERS en los capítulos VI y VII.

d. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, de sus siglas en inglés *Atomic Force microscopy*) fue utilizada para analizar la topografía y rugosidad de determinados recubrimientos.

En el AFM se barre la superficie de la muestra con una punta afilada situada en el extremo de una palanca flexible manteniendo constante una pequeña fuerza de interacción. El movimiento de barrido lo realiza un escáner piezo-eléctrico, y la interacción punta/muestra se monitoriza reflejando un láser en la parte trasera de la palanca que se recoge en un detector fotodiodo. El fotodiodo está dividido en 4 segmentos, y las diferencias de voltaje entre los distintos segmentos determinan con precisión los cambios en la inclinación o amplitud de oscilación de la muestra.

Las medidas se realizaron con un equipo de AFM Multimode 8 en modo *tapping* de Veeco-Bruker. El modo *tapping* mide la topografía tocando intermitentemente la superficie de la muestra con una punta oscilante. Se eliminan de este modo las fuerzas laterales y de presión que puedan dañar las muestras. La punta utilizada fue una OMCL-AC240TN-W2 de Olympus.

Las imágenes de AFE fueron tratadas y analizadas con el software *Gwyddion 2.45*, para obtener datos de la densidad de nanopartículas sobre la superficie, grosor de las capas y rugosidad, utilizándose siempre para este fin datos de al menos cinco imágenes de AFM.

Los análisis de microscopia se realizaron en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) del Instituto de Nanociencia de Aragón – Universidad de Zaragoza. Agradecemos al LMA el acceso a los instrumentos, y a los técnicos su paciencia y experiencia.

e. Espectroscopía UV-VIS-NIR

La espectroscopía ultravioleta-visible-infrarrojo cercano (UV-VIS-NIR) se empleó para evaluar la adsorción de la luz de disoluciones y sustratos SERS en el rango del ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. Este dato nos ayuda a seleccionar la longitud de onda del Raman más adecuada para iluminar los sustratos SERS.

Las medidas de adsorción de las disoluciones de nanopartículas se realizaron con el espectrofotómetro V-670 de Jasco en el rango de longitudes de onda de 300 a 1000 nm.

El equipo utilizado para las medidas de adsorción del sustrato SERS (SPR, de sus siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance*) dependieron de la naturaleza del soporte de este.

- Soporte de Si/SiO₂. Se midió con el espectrofotómetro Varían Cary 50 en el rango de 300 a 1000 nm. Este equipo tiene una configuración de medida en transmitancia, es decir, se recoge la luz que atraviesa la muestra y que el propio equipo la transforma en espectro de adsorción. Para ello, la muestra/soporte debe dejar pasar la luz. En nuestro caso, el sustrato SERS se preparó sobre un soporte de pyrex (4 mm × 8 mm), misma naturaleza y comportamiento que el SiO₂/Si pero transparente en este rango de longitudes de onda. El protocolo de preparación del sustrato SERS sobre pyrex fue el mismo que se siguió para depositar cada nanopartícula sobre Si/SiO₂. Antes de medir el sustrato SERS, se midió el espectro de un sustrato pyrex sin nanopartículas que se utilizó como línea base.
- Microdispositivos de PDMS. Se cortaron y midieron directamente con el equipo Varían Cary 50 en el rango de 300 a 1000 nm. Antes de medir el microdispositivo

SERS, se midió el espectro de una plancha de PDMS sin nanopartículas que se utilizó como línea base.

- Soportes de acero, grafito o capas finas continuas de metales sobre estructuras 3D se utilizó el espectrofotómetro V-670 de Jasco con el accesorio de reflectancia difusa (DR) ISV-722, que tiene una esfera integradora de 60 mm. El sustrato SERS se coloca en un soporte en la ventana de la esfera integradora, podemos medir el espectro reflejado por el sólido, que el propio equipo transforma matemáticamente a transmitida o absorbancia. Como material de referencia o “blanco” se utilizó BaSO₄, un material usado como blanco de medidas de reflectancia [456–458].

Los sustratos SERS con soporte de SiO₂/Si no se pueden medir con la esfera integradora puesto que se produce el efecto óptico de interferencia de Fabry-Pérot o resonador óptico [459–461]. En óptica un interferómetro de Fabry-Pérot, normalmente, está constituido por una placa con dos superficies reflectantes o dos espejos altamente reflectantes. En nuestro caso la capa de SiO₂ de 1 μm depositada sobre la oblea de Si. Cuando se mide su espectro de adsorción en función de la longitud de onda se observa una oscilación sinusoidal (Figura A.I.1). La variación en la función es debida a las sucesivas reflexiones de la luz entre las superficies y depende de la longitud de onda, del ángulo de incidencia de la luz, el grosor de la capa y el índice de refracción del material.

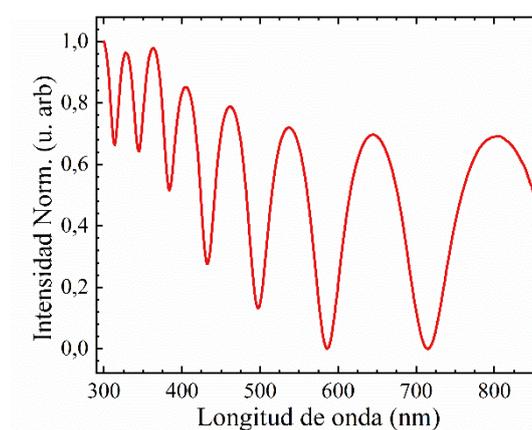


Figura A.I.1 Espectro de SiO₂/Si debido a la interferencia de Fabry-Pérot

f. Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

Para evaluar la funcionalización de las partículas y los recubrimientos SERS a través de los grupos funcionales se utilizó la espectroscopía infrarroja por transformada de

Fourier (FTIR) con un equipo Vertex 70 de Bruker, que tiene un rango de espectral de 6000 a 400 cm^{-1} . El equipo cuenta además con un microscopio HYPERION para realizar medidas de FTIR con mayor sensibilidad y resolución espacial.

Las medidas se realizaron con la configuración reflectancia total atenuada (ATR de sus siglas en inglés, *Attenuated total reflectance*) con el módulo MKII Golden Gate ATR en el rango espectral de 4000 a 700 cm^{-1} . Cada espectro es el promedio de 40 scans.

g. Análisis termogravimétrico (TGA)

Con el fin de evaluar el comportamiento de determinados materiales y compuestos en función de la temperatura se llevó a cabo el análisis termogravimétrico (TGA). Además, se utilizó para determinar la temperatura de desorción de los agentes neurotóxicos de los materiales adsorbentes.

Los análisis se realizaron con una termobalanza TGA Q5000 de TA Instruments, que cuenta con un auto-muestreador. Los experimentos se realizaron entre 25 y 600 $^{\circ}\text{C}$, en una atmósfera de N_2 y con una rampa de calentamiento de 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

h. Adsorción de N_2

Las áreas superficiales, volumen y tamaño de poro de los materiales mesoporosos se han medido con un equipo TriStar 3000 y de los materiales microporosos con un equipo ASAP2020, ambos de Micrometrics. Las muestras se sometieron a un proceso de degasificación a vacío a una temperatura de 200 $^{\circ}\text{C}$ durante 8 h previo a la medida.

Los datos obtenidos fueron tratados y analizados con el software MicroActive v4.03 de Micrometrics. Se determinó el área superficial específica mediante el ajuste lineal de la isoterma al modelo de Brunauer-Emmet-Teller (BET) en el rango de presiones de 0.05 a 0.20 P/P_0 y utilizándose al menos cinco puntos de la isoterma en dicho rango. Para determinar la distribución de tamaños de poro se utilizó el método basado en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT, de sus siglas en inglés *density functional theory*). El modelo DFT se basa en modelos termodinámicos entre adsorbato y superficie.

i. Dispersión dinámica de la luz y Análisis de Potencial Z

El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas, así como su carga superficial se midió usando la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y el análisis de Potencial Z mediante análisis de fase de dispersión de luz (ZetaPALS), respectivamente. Para ambas medidas se utilizó el equipo Brookhaven 90 Plus. Para poder realizarse las medidas las disoluciones deben ser estables y con una dilución adecuada, y para el uso del potencial Z, además, deben tener suficiente carga iónica. En caso de no alcanzarse la conductividad mínima se añadió KCl 1 mM.

j. Espectroscopía de Emisión Atómica con plasma inducido por microondas (MP-AES)

El rendimiento de la síntesis de nanopartículas de oro se midió por espectroscopía de emisión atómica con plasma inducido (MP-AES).

Al finalizar la reacción las nanopartículas se centrifugaron a 21000 rpm durante 20 min y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante contiene los reactivos sin reaccionar y esto fue lo que se analizó por MP-AES. Se prepararon disoluciones para la calibración a partir de patrones comerciales de oro y se les añadió citrato de sodio 0,1% en peso para simular las mismas condiciones que el sobrenadante de la síntesis. Estas disoluciones (calibrado y muestra) se alimentaron a un equipo 4200 MP-AES de Agilent. Las disoluciones fueron succionadas por una bomba peristáltica y alimentadas a una cámara de nebulización ciclónica de pyrex para generar una niebla que fue conducida al plasma. La emisión de este plasma a 267,595 nm se detectó y relacionó con los valores de concentración de Au^{3+} sin reaccionar, y este con el rendimiento de la reacción de reducción de Au^{3+} a Au^0 .

k. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Se ha utilizado la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) para estudiar la composición superficial de los dispositivos poliméricos recubiertos de nanopartículas estabilizadas con POMS, AuNP@POM.

El equipo utilizado es un espectrómetro de fotoelectrones AXIS Ultra DLD de Kratos Analytical. El equipo utiliza una fuente monocromática de Al ($K\alpha = 1486,6 \text{ eV}$) trabajando a 15 kV y 10 mA. Las muestras se dejaron a vacío en una precámara a

temperatura ambiente antes de los análisis. Los espectros obtenidos se analizaron con el software CasaXPS, ajustando las curvas con sumas de funciones Lorentzianas y Gaussianas previa sustracción de la línea base.

l. Perfilometría

El grosor de las capas finas se caracterizó mediante perfilometría utilizando el equipo P-6 Stylus Profiler de la marca comercial KLA Tencor.

m. Ángulo de Contacto

El ángulo de contacto se ha medido para conocer la mojabilidad de los sustratos SERS. El ángulo de contacto se refiere al ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con un sólido. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación que existe entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas del líquido. Cuando las fuerzas adhesivas con la superficie del sólido son muy grandes en relación con las fuerzas cohesivas, el ángulo de contacto es menor de 90°, teniendo como resultado que líquido moja la superficie.

El equipo utilizado es un ATTENSION THETA200Auto1 equipado con una cámara CCD. La fuente de luz está situada en frente de la cámara. Este equipo nos permite conocer el ángulo de contacto estático. Para ello, con la jeringuilla Hamilton® que lleva acoplada el equipo, una gota de agua de 6 μL (1 mm de diámetro) se coloca sobre la superficie del sustrato SERS. Cuando se alcance el “equilibrio” se realizará la lectura del ángulo de contacto adquiriendo imágenes con la cámara CCD que luego son procesadas por el propio software del equipo.

ANEXO II. Protocolo de medida del Factor de Aumento Analítico (AEF)

a. Medida en condiciones Raman de la disolución de referencia

Se coloca una gota de 2 μL de la disolución de referencia sobre un soporte de SiO_2 . A continuación, se enfoca el objetivo óptico junto al borde de la gota, hacemos máximo el pico del silicio desplazado a 519 cm^{-1} . Una vez enfocado nos elevamos en eje-z y movemos el objetivo dentro de la gota. Tomar la precaución de que el objetivo no toque la gota, sobre todo con el de 785 nm que tiene la menor distancia de trabajo. Una vez situados dentro de la gota, maximizamos la señal dentro del volumen muestreado, desplazándonos en el eje-z hasta que la intensidad sea máxima, y tras ello, ajustamos la potencia subiéndola y bajándola hasta alcanzar, nuevamente, la máxima señal de la molécula. En el caso de que durante el enfoque o la medida la disolución se evapore, repetiremos el procedimiento, puesto que es necesario que la medida sea en fase líquida. La Figura A.II.1 muestra un esquema de las etapas más importantes del proceso de medida de la disolución de referencia en condiciones Raman.

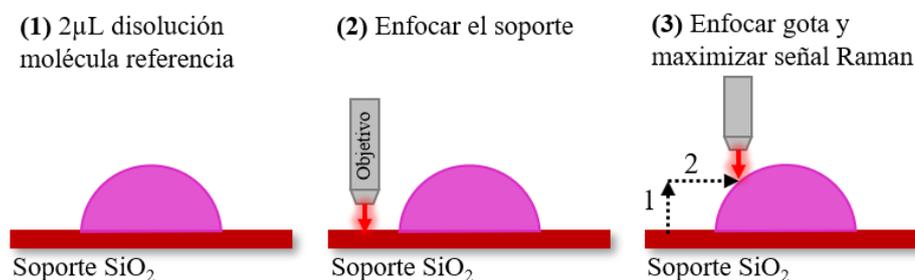


Figura A.II.1 Protocolo de medida de la disolución de referencia en condiciones Raman para el cálculo del AEF.

La medida se repetirá 5 veces, calculando la media y la desviación estándar. Este valor de intensidad media será el utilizado como I_{Raman} en la ecuación del AEF, Ecuación 2.4 (pág. 50).

Los espectros obtenidos para R6G en cada una de las condiciones se muestran en la Figura A.II.2, y los espectros de 4-NBT en la Figura A.II.3.

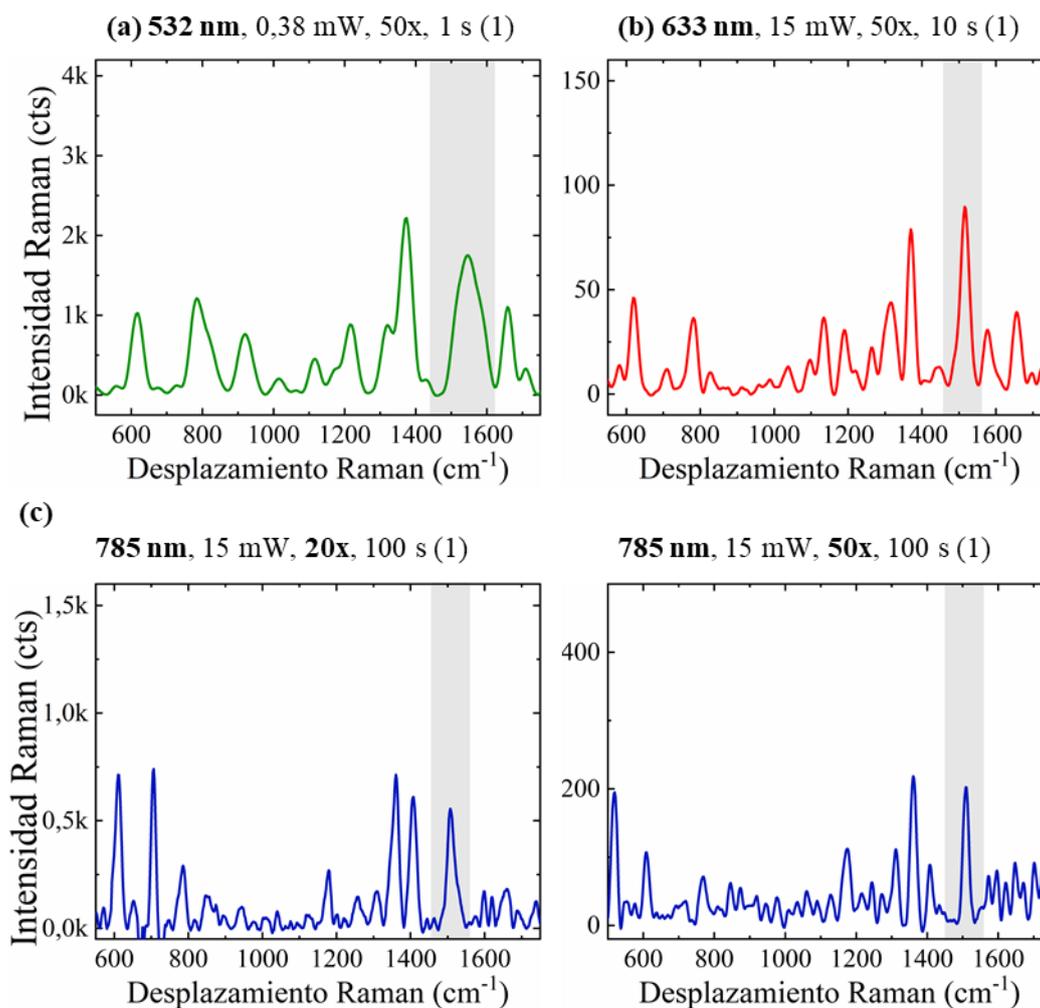


Figura A.II.2 Espectros de la R6G 1mM adquiridos en condiciones Raman con las longitudes de onda de excitación de **(a)** 532 nm, **(b)** 633 nm y **(c)** 785 nm. Sobre cada gráfica se indica el objetivo, potencia del láser, tiempo de adquisición y número de acumulaciones (entre paréntesis). Sombreada aparece la banda utilizada en el cálculo del AEF, 1510 cm^{-1} , *stretching* del enlace P-C.

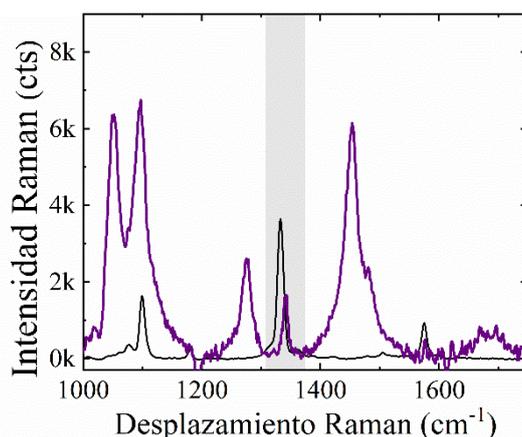


Figura A.II.3 Espectro del 4-NBT adquirido en condiciones Raman. Condiciones de medida: longitud de onda de excitación 785 nm, objetivo 20x, potencia del láser 50mW y tiempo de integración 50 s. En negro el espectro del 4-NBT puro. Sombreada aparece la banda utilizada en el cálculo del AEF, 1338 cm^{-1} , *stretching* simétrico del enlace NO_2 , el resto de las bandas pertenecen al etanol.

b. Medida en condiciones SERS de la disolución de referencia

La Figura A.II.4 muestra un esquema resumen del protocolo de medida del AEF en condiciones SERS. En primer lugar, el sustrato SERS se incuba en 2 mL de una disolución $1\ \mu\text{M}$ de la molécula de referencia durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, se lava con agua destilada o etanol absoluto, dependiendo del solvente de la disolución, y se deja secar al aire. Cuando está seco se lleva al equipo Alpha 300 para comenzar con las medidas. Una vez enfocado el objetivo óptico, se maximiza la señal SERS de la molécula desplazándonos ligeramente en el eje-z, y subiendo y bajando la potencia del láser. Tras alcanzar el máximo de señal, pasamos a optimizar el tiempo de adquisición del espectro hasta conseguir los espectros más nítidos.



Figura A.II.4 Protocolo de medida de la disolución de referencia en condiciones SERS para el cálculo del AEF.

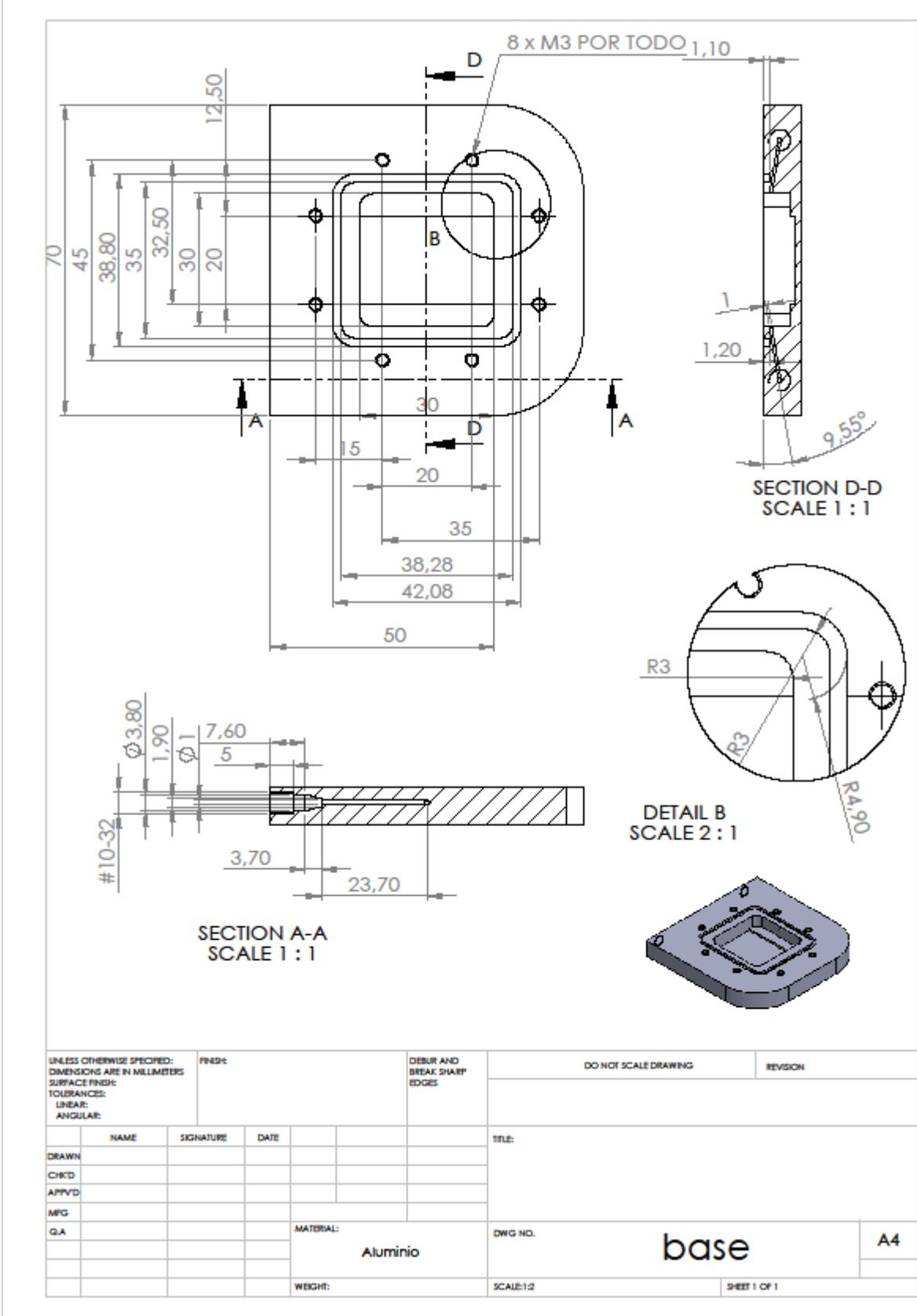
Se medirán 3 sustratos SERS realizando entre 3 y 4 áreas de alrededor $250\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$ y 100 espectros/área en cada uno de ellos, se promediarán y se

calculará la desviación estándar. Este valor de intensidad promedio será el valor de I_{SERS} de la ecuación del AEF, Ecuación 2.4 (pág. 50).

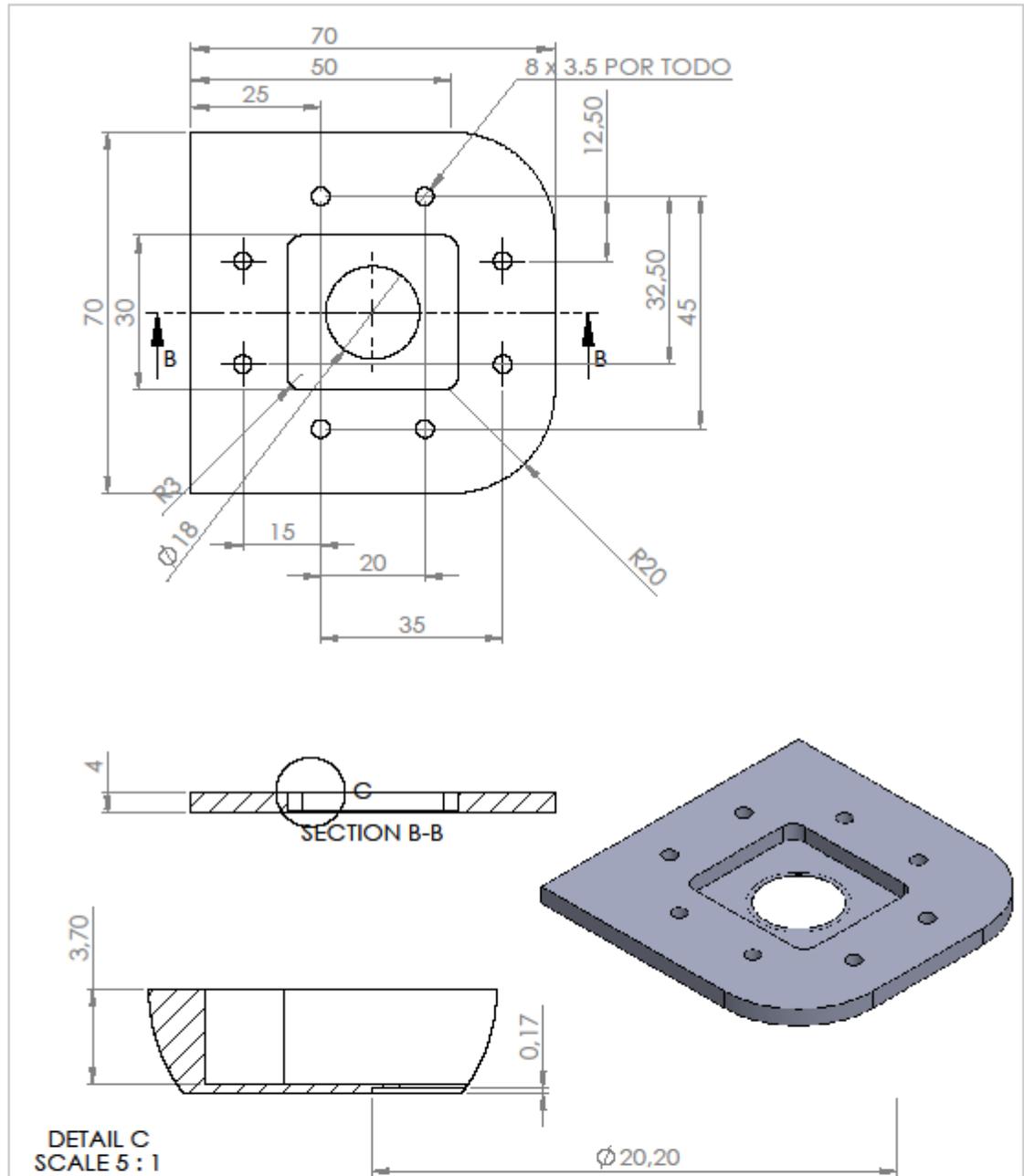
Para un mismo sustrato SERS las condiciones de medida en el cálculo del AEF no tienen por qué ser las mismas que las utilizadas en la caracterización de las capacidades de detección SERS de los diferentes analitos, teniendo que volver a optimizarlas en la caracterización de las capacidades de detección.

ANEXO III. Planos de la celda de gases

- Base

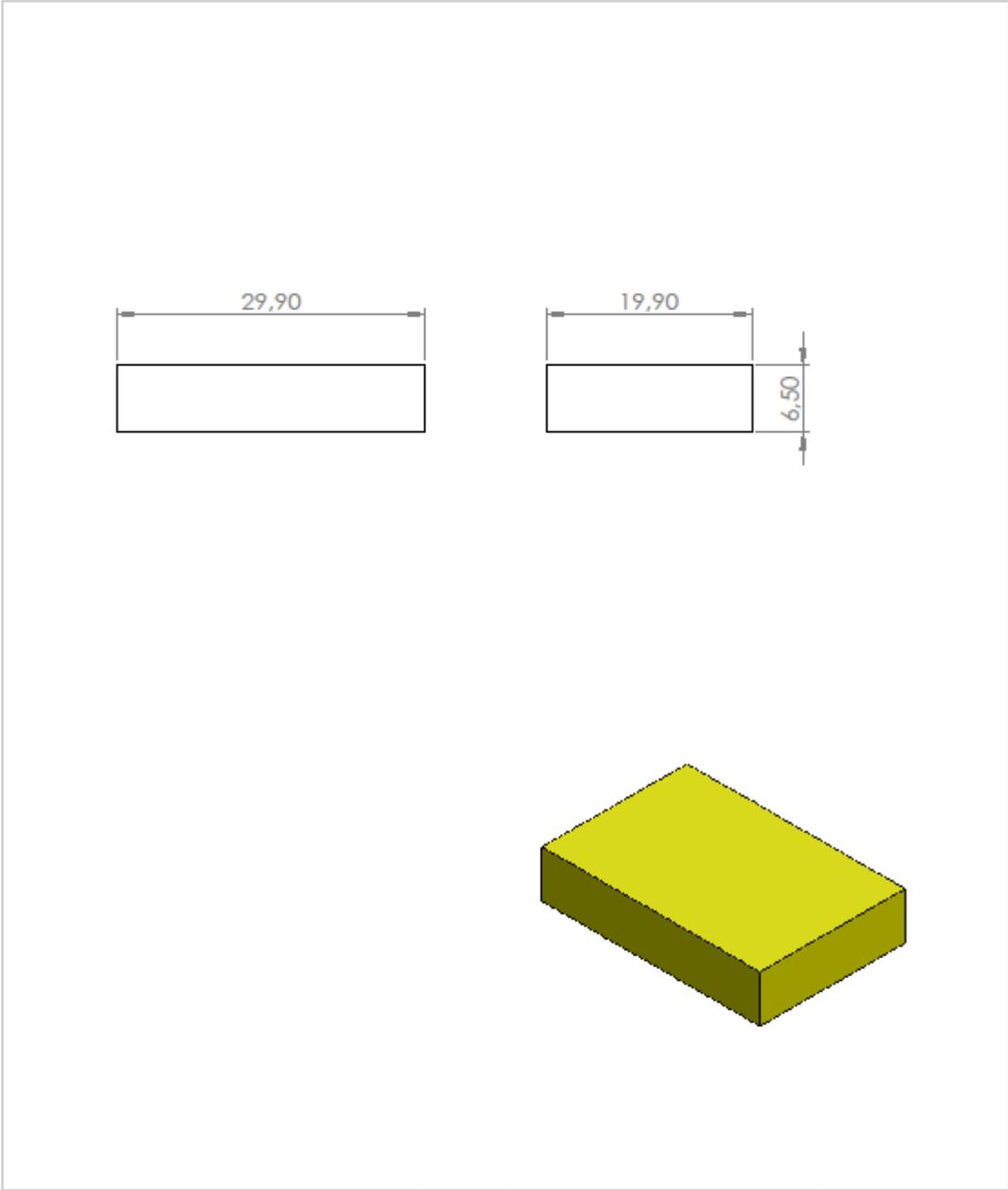


- Tapa



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS SURFACE FINISH: TOLERANCES: LINEAR: ANGULAR:		FINISH:	DEBUR AND BREAK SHARP EDGES		DO NOT SCALE DRAWING	REVISION
NAME	SIGNATURE	DATE	TITLE:			
DRAWN						
CHK'D						
APP'VD						
MFG						
QA			MATERIAL: Aluminio	DWG NO.	tapa	A4
			WEIGHT:	SCALE:1:1	SHEET 1 OF 1	

- Calce



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS SURFACE FINISH: TOLERANCES: LINEAR: ANGULAR:		FINISH:		DEBUR AND BREAK SHARP EDGES		DO NOT SCALE DRAWING		REVISION	
DRAWN		SIGNATURE		DATE		TITLE:			
CHK'D									
APP'VD									
MFG									
Q.A.						MATERIAL: Aluminio		DWG NO. calce_muestra05mm	
						WEIGHT:		SCALE:2:1	
								SHEET 1 OF 1	

ANEXO IV. Métodos de deposición o recubrimiento

A continuación, se detallan los distintos métodos de deposición con los que se han depositado las nanopartículas sobre los soportes SERS, en busca de una deposición homogénea y reproducible.

a. Deposición capa-sobre-capas (*Layer-by-Layer*)

Esta técnica se utilizó para preparar algunos de los sustratos SERS descritos en esta tesis. Los recubrimientos de nanopartículas obtenidos se caracterizan por su homogeneidad y reproducibilidad.

La técnica de deposición de capa-sobre-capas (LbL, de sus siglas en inglés *Layer-by-layer*) es la técnica más utilizada para el autoensamblado secuencial de capas con diferente carga electrostática. El método LbL es simple y versátil, haciendo posible el control del espesor de la capa, morfología y funcionalidad con una excelente precisión y trabajando en condiciones ambientales.

La técnica LbL se basa en la atracción electrostática entre las cargas eléctricas de las moléculas o nanopartículas que forman cada monocapa (Figura A.IV.1). La formación del ensamblado multicapa implica la consecutiva adsorción de moléculas iónicas positivas o negativas que se encuentran en unos adecuados electrolitos, y es autorregulable, puesto que una vez la capa está “saturada” de moléculas de una determinada carga se detiene el ensamblaje. LbL también puede formarse mediante enlaces de hidrógeno, enlaces covalentes, así como otras diversas interacciones.

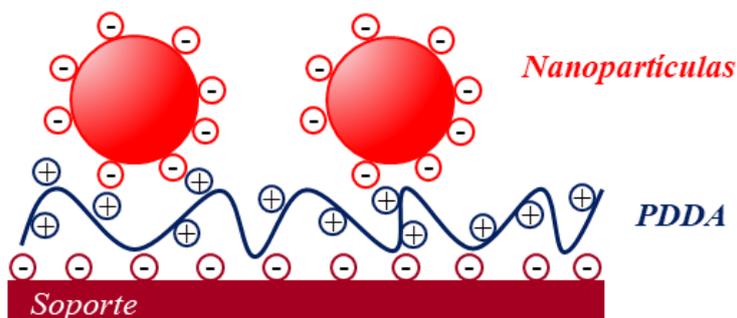


Figura A.IV.1 Esquema de una bicapa autoensamblada electrostáticamente.

Dentro del autoensamblado electrostático existen diferentes técnicas LbL como LbL por inmersión o LbL por *spray* que varían en las condiciones en las cuales el sustrato

es expuesto a los polielectrolitos. En nuestro caso hemos utilizado el LbL por inmersión, el proceso de manera genérica conlleva varios pasos, los cuales se enumeran a continuación:

1. Sumergir el soporte SERS en el electrolito catiónico (+). En nuestro caso una disolución 0,2% v/v en agua de cloruro de poli(alildimetilamonio) (PDDA, 20% en peso).
2. Lavado con agua.
3. Secado del soporte.
4. Sumergir en la solución de nanopartículas (-).
5. Lavado del sustrato.
6. Secado del sustrato SERS.

b. Recubrimiento por rotación “Spin coating”

El proceso de recubrimiento conocido como *spin coating* consiste en cubrir con una disolución del material deseado un sustrato mientras este rota y por acción combinada de la fuerza centrípeta y la tensión superficial de la disolución, el líquido se extiende formando una película homogénea, y tras evaporarse deja el material formando un recubrimiento homogéneo. Este proceso consta de tres etapas [180,181]:

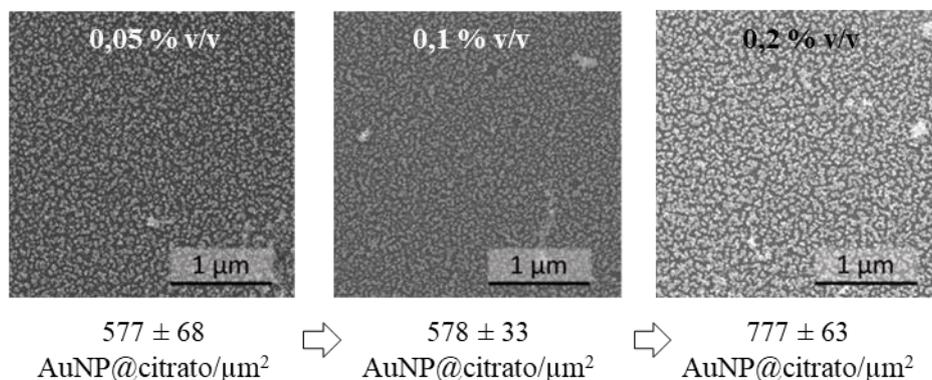
- i) Adición de la solución o suspensión, donde se añade una cantidad suficiente de líquido con el material a depositar como para que cubra la totalidad del sustrato.
- ii) Reducción de la película dominada por el flujo del fluido, donde, por efecto de la fuerza centrípeta, al aumentar la velocidad de rotación, la capa de líquido se va haciendo más fina y uniforme. El espesor final y la homogeneidad de la cobertura depende tanto de la velocidad alcanzada como de la rampa de aceleración utilizada para conseguirla.
- iii) Evaporación del solvente, etapa final en la cual manteniendo esa velocidad la combinación de flujo de líquido y la evaporación del disolvente dejan solo una fina capa de material de recubrimiento. En función del función del disolvente utilizado y su volatilidad, la segunda y tercer etapas pueden ocurrir por separado, pero en la mayoría de las situaciones estas etapas ocurren simultáneamente.

A continuación, se resume la optimización del depósito por *spin coating* de la capa de PDDA sobre SiO₂/Si y cómo influye en el posterior LBL de las AuNP@citrato, y el depósito de nanopartículas de sílice sobre SiO₂/Si.

i. Optimización recubrimiento de PDDA

La Figura A.IV.2 muestra como al aumentar la concentración de la disolución de PDDA y reducir la velocidad de espineado de la misma aumenta la densidad del recubrimiento de AuNP@cittrato depositadas, posteriormente, por interacciones electrostáticas.

(a) Influencia de la concentración de PDDA. Condiciones 3000 rpm, 60 s



(b) Influencia de la velocidad de espineado. Condiciones PDDA 0,2% v/v, 60 s

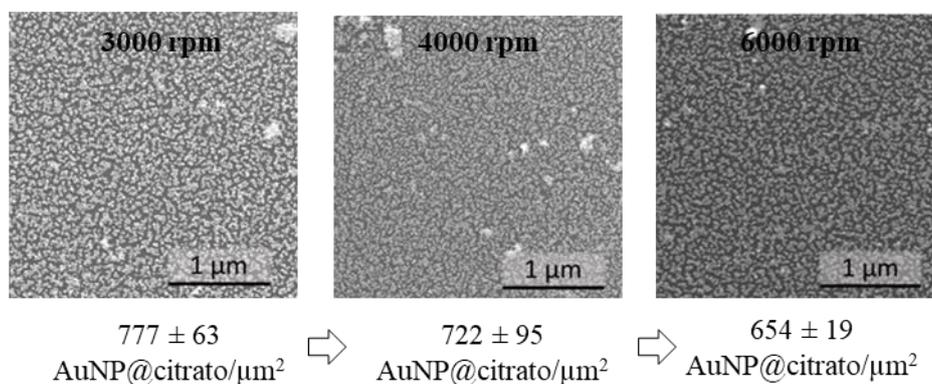


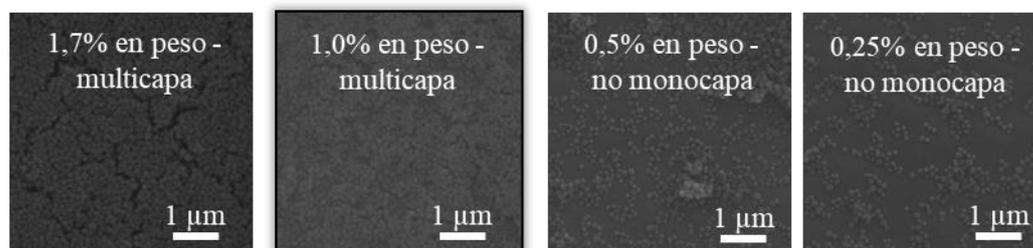
Figura A.IV.2 Influencia de (a) la concentración de PDDA y (b) la velocidad de espineado en la densidad de nanopartículas AuNP@cittrato sobre SiO₂/Si. La densidad de nanopartículas se calculó a partir de 10 imágenes SEM de cada condición.

ii. Optimización recubrimiento MCM48

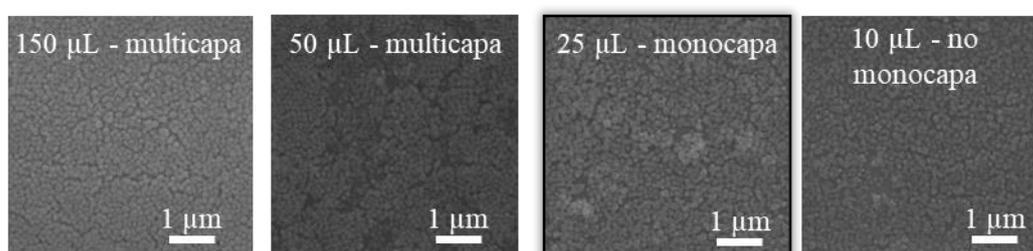
Al disminuir la concentración de Au@MCM48 se pasa de tener una multicapa a no formarse la monocapa, Figura A.IV.3a. Al disminuir el volumen de nanopartículas, para

una concentración dada, se pasa de multicapa a monocapa, Figura A.IV.3b. Al aumentar la velocidad de espineado se pasa de no formarse la monocapa, a multicapa y, finalmente, para altas velocidades tampoco se forma la monocapa, Figura A.IV.3c.

(a) **Influencia de la concentración de nanopartículas.** $V_{\text{dispersado}} = 25 \mu\text{L}$, 1000 rpm y 60s



(b) **Influencia del volumen dispersado.** Concentración 1,7% en peso, 1000 rpm y 60s



(c) **Influencia de la velocidad de espineado.** $V_{\text{dispersado}} = 25 \mu\text{L}$, 1,7% en peso y 60s

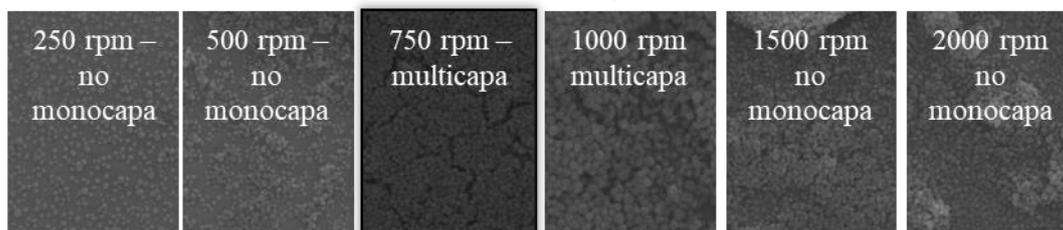


Figura A.IV.3 Influencia de (a) la concentración de Au@MCM48, (b) el volumen dispersado y (c) la velocidad de espineado en la densidad de nanopartículas Au@MCM48 depositadas por spin coating sobre un soporte de SiO_2/Si .

c. Deposición por *Sputtering*

Esta técnica se utilizó para fabricar las nanoestructuras de oro sobre las nanotrincheras de silicio en el Capítulo 6.

La pulverización catódica o *sputtering* es un proceso físico en el que se produce la vaporización de los átomos de un material sólido denominado “blanco” mediante el bombardeo de éste por iones energéticos. El *sputtering* está causado principalmente por el intercambio de momento entre los iones y los átomos del material, debido a colisiones.

Algunos factores que influyen en el rendimiento son la energía de los iones incidentes, sus masas y las de los átomos del blanco y la energía del enlace del sólido.

Los iones para el proceso de *sputtering* se obtienen de un plasma que se genera en el interior del equipo de pulverización. Los átomos pulverizados, aquellos expulsados a la fase gaseosa, no están en su estado de equilibrio termodinámico. Por tanto, tienden a condensarse al chocar con la superficie del sustrato o con cualquier superficie de la cámara de pulverización (Figura A.IV.4). Esto tiene como resultado la deposición del material pulverizado en todas las superficies y ángulos del sustrato, se trata, por tanto, de un proceso de recubrimiento no direccional. También es posible depositar materiales compuestos utilizando blancos elementales con gases reactivos. Por ejemplo, se depositan óxidos y nitruros de metales utilizando atmósferas reactivas de oxígeno y nitrógeno, respectivamente.

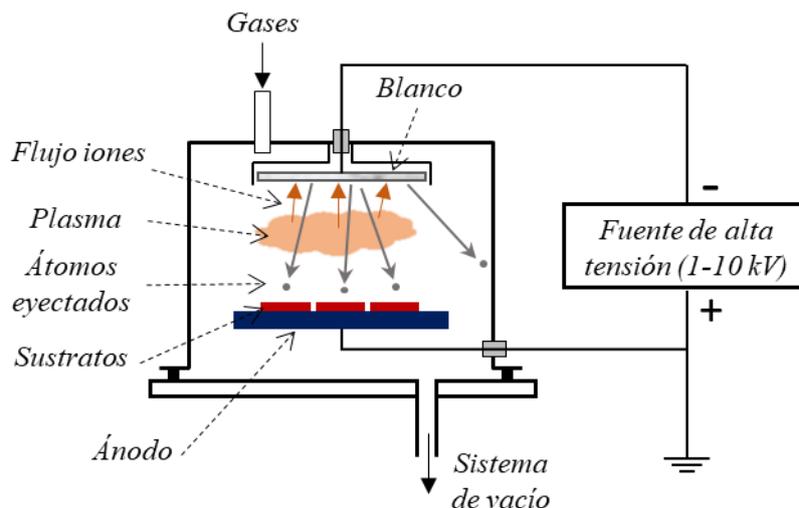


Figura A.IV.4 Esquema del equipo de deposición por pulverización catódica o *sputtering*

d. Evaporadora por Haz de Electrones

Esta técnica se utilizó para depositar las capas continuas de plata sobre los sustratos 3D del Capítulo 7.

Esta técnica está basada en el calentamiento producido por el bombardeo de haz de electrones de alta energía sobre el material a depositar. El haz de electrones es generado mediante un cañón de electrones, el cual utiliza la emisión termoiónica de electrones producida por un filamento incandescente (cátodo). Los electrones emitidos, en forma de

corriente eléctrica, son acelerados hacia un ánodo mediante una diferencia de potencial muy elevada (kilovoltios). El ánodo es el crisol donde se encuentran las pepitas del metal.

Debido a la posibilidad de focalizar los electrones es posible un calentamiento muy localizado sobre el material a evaporar, y con un a alta densidad de potencia de evaporación. Esto permite un control de la velocidad de evaporación, y, sobre todo, la posibilidad de depositar metales de alto punto de fusión. En la Figura A.IV.5 aparece un esquema del equipo de evaporación por bombardeo electrónico Edwards auto-500 de BOC Edw utilizado para evaporar las capas metálicas.

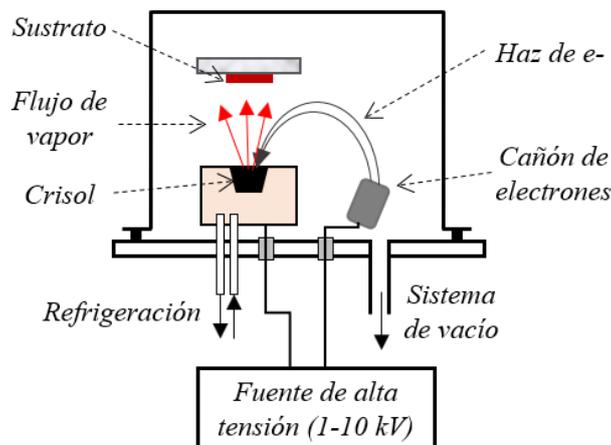


Figura A.IV.5 Esquema del equipo de evaporación por haz de electrones

Las condiciones de evaporación dependen del metal a depositar:

- Capas finas de plata: vacío inicial 3×10^{-7} mbar; intensidad del haz 30-32 mA; voltaje de aceleración 5,3 kV.

ANEXO V. Concentración de DMMP expresada como presión relativa

La presión total de una mezcla es igual a la suma de las presiones parciales de sus componentes, asumiendo que los gases no tienen reacciones químicas entre ellos, la ley de presiones parciales de Dalton se define como:

$$P_i = x_i \cdot P_T \quad \text{Ecuación A.V.1}$$

Donde P_i y x_i representan la presión parcial y la fracción molar del i -ésimo componente en la mezcla, respectivamente, y P_T es la presión total.

Y usando la concentración en base volumétrica de cada componente de la mezcla:

$$P_i = C_i \cdot P_T$$

Donde C_i es la concentración del componente i .

Por ejemplo, para la concentración de 2.5 ppmV at 25°C and 1 atm.

$$P_{2.5} = \frac{2.5 \mu L}{L} \cdot 10^{-6} \cdot 101325 Pa = 0.25 Pa$$

Considerando que la presión de saturación del DMMP a 25°C es 109 Pa:

$$\frac{P_{2.5}}{P_0} = \frac{0.25 Pa}{109 Pa} = 2,32 \times 10^{-3}$$

Para las demás concentraciones ver Tabla A.V.1:

Tabla A.V.1 Presión de vapor de las diferentes concentraciones de DMMP alimentadas a la plataforma Au@Ag@ZIF8

Concentración (ppbV)	P_{DMMP} (Pa)	P_{DMMP} / P_0
2500	2.5×10^{-1}	2.3×10^{-3}
900	9.1×10^{-2}	8.4×10^{-4}
500	5.1×10^{-2}	4.6×10^{-4}
250	2.5×10^{-2}	2.3×10^{-4}
100	1.0×10^{-2}	9.3×10^{-5}
45,2	4.6×10^{-3}	4.2×10^{-5}

ANEXO VI. Número de moléculas de paraoxon-metil en el área escaneada de los sustratos SERS con micropirámides G1

Número de moléculas en la disolución de incubación 10^{-18} M

$$\begin{aligned}
 C \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) \cdot \text{Volumen}_{\text{disolución incubación}} (\text{L}) \cdot \text{Num. Avogrado} \left(\frac{\text{moléculas}}{\text{mol}} \right) \\
 = 1 \times 10^{-18} \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) \cdot 0,025 \text{ L} \cdot 6,023 \times 10^{23} \left(\frac{\text{moléculas}}{\text{mol}} \right) \\
 = \mathbf{15057 \text{ moléculas}}
 \end{aligned}$$

Y para el resto de las concentraciones de paraoxon estudiadas:

Tabla A.VI.1 Número de moléculas en las disoluciones de incubación de paraoxon.

Concentración paraoxon	Número de moléculas en la disolución de incubación	Número de moléculas por área escaneada
10^{-6} M	$1,5 \cdot 10^{16}$	$2,25 \cdot 10^{13}$
10^{-9} M	$1,5 \cdot 10^{13}$	$2,25 \cdot 10^{10}$
10^{-12} M	$1,5 \cdot 10^{10}$	$2,25 \cdot 10^7$
10^{-15} M	$1,5 \cdot 10^7$	$2,25 \cdot 10^4$
10^{-18} M	$1,5 \cdot 10^4$	23

Distribución de las moléculas sobre el sustrato SERS con micropirámides G1

- Área total del sustrato SERS $\rightarrow 0,2 \text{ cm}^2$
- Área muestreada con el Raman $\rightarrow 200 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m} = 3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$

Asumiendo una distribución homogénea de las moléculas sobre todo el sustrato G1:

$$\text{N}^\circ \text{ áreas} = \frac{\text{Área del sustrato}}{\text{Área mapeada}} = \frac{0,2 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{3 \times 10^4 \mu\text{m}^2} = 666 \text{ áreas}$$

$$\frac{\text{Moléculas en la disolución de incubación}}{\text{número de áreas en el sustrato}} = \frac{15057 \text{ moléculas}}{666 \text{ áreas}} = \mathbf{23} \frac{\text{moléculas}}{\text{área}}$$

Superficie expuesta en la parte superior de las micropirámides G1 (Figura A.VI.1).

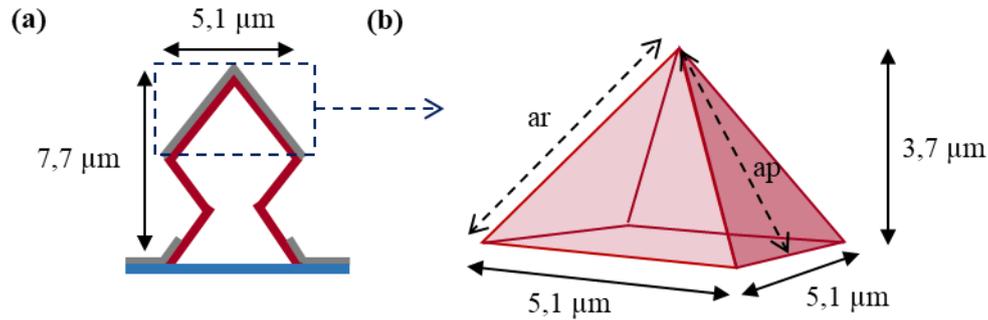


Figura A.VI.1 Dimensiones de la micropirámide G1

El espaciado entre microestructuras G1 es de $20 \mu\text{m}$, por lo que cada $400 \mu\text{m}^2$ habrá una micropirámide G1

$$\begin{aligned} \text{N}^{\circ} \text{ micropirámides G1} &= \frac{\text{área total del sustrato SERS}}{\text{área ocupada por una micropirámide G1}} \\ &= \frac{0,2 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2}{400 \frac{\mu\text{m}^2}{1 \text{ G1}}} = 5 \cdot 10^4 \text{ micropirámides G1} \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta las dimensiones de la Figura A.VI.1, la longitud del apotema es:

$$ap = \sqrt{3,7^2 + \left(\frac{5,1}{2}\right)^2} = 4,5 \mu\text{m}$$

Y el Área expuesta en una micropirámide:

$$\frac{\text{área expuesta}}{1 \text{ G}} = \left(\frac{5,1 \times 4,5}{2}\right) \times 4 \text{ caras} = 46,9 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{micropirámide G1}}$$

Finalmente, el área expuesta total es:

$$5 \cdot 10^4 \frac{\text{micropirámides G1}}{\text{sustrato SERS}} \times 46,9 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{micropirámide G1}} = 2,3 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$$

Moléculas necesarias para formar la monocapa sobre la microestructura G1

La molécula de paraoxon tiene una cross-section de $0,2 \text{ nm}^2$ [442]. Asumiendo la adsorción del paraoxon en un empaquetamiento hexagonal sobre la superficie de Ag cada molécula ocupará un área de $0,65 \text{ nm}^2$.

Nº moléculas paraoxon para llenar la monocapa

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{área expuesta/micropirámide G1}}{\text{área ocupada/molécula paraoxon}} = \frac{2,3 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2}{0,65 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^2} \\ &= \mathbf{3,6 \cdot 10^{12} \text{ moléculas de paraoxon}} \end{aligned}$$

La Tabla A.VI.1 muestra el número de moléculas presentes en cada una de las disoluciones de paraoxon estudiadas. Con las moléculas presentes en la disolución de concentración 10^{-9} M podríamos formar la monocapa, incluso tendríamos un exceso de moléculas. Mientras que para la siguiente concentración estudiada 10^{-12} M tenemos un defecto de estas, dejando zonas de la parte superior de la micropirámide sin cubrir.

Estimación del área expuesta en las aristas de las micropirámides G1.

Teniendo en cuenta las dimensiones de la Figura A.VI.1, la longitud de la arista es:

$$ar = \sqrt{4,5^2 - \left(\frac{5,1}{2}\right)^2} = 5,17 \mu\text{m}$$

Consideramos que la zona con mayor cantidad de defectos tendría un grosor de 2 nm sobre la arista:

$$\begin{aligned} \frac{\text{área expuesta (hot spot)}}{\text{micropirámide G1}} &= \text{aristas caras laterales} + \text{aristas de la base} \\ &= ((5,17 \mu\text{m} \times 2 \cdot 10^3 \mu\text{m}) \times 4 \text{ aristas laterales}) \\ &+ ((5,1 \mu\text{m} \times 2 \cdot 10^3 \mu\text{m}) \times 4 \text{ aristas base}) = 0,08 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{G1}} \end{aligned}$$

Por tanto, el área total cubierta de hot-spots es:

$$5 \cdot 10^4 \frac{\text{micropirámides G1}}{\text{sustrato SERS}} \times 0,08 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{micropirámide G1}} = 4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$$

Y el número de moléculas necesario para cubrirla:

Nº moléculas paraoxon para cubrir las aristas

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{área expuesta/micropirámide G1}}{\text{área ocupada/molécula paraoxon}} = \frac{4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2}{0,65 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^2} \\ &= \mathbf{6,1 \cdot 10^9} \text{ moléculas de paraoxon} \end{aligned}$$

En este caso con la disolución de 10^{-10} M ya tendríamos formada la monocapa de moléculas de paraoxon que se excita con los *Edge plasmon polaritons* (EPPs)

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R.T. Delfino, T.S. Ribeiro, J.D. Figueroa-villar. “Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review” *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, Vol. 20 (3), pp.407–428.
- [2] H. John, M.J. van der Schans, M. Koller, H.E.T. Spruit, F. Worek, H. Thiermann, D. Noort. “Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network” *Forensic Toxicol.* **2018**, Vol. 36 (1), pp.61–71.
- [3] A.T. Tu. “Toxicological and Chemical Aspects of Sarin Terrorism in Japan in 1994 and 1995” *Toxin Rev.* **2007**, Vol. 26 (3), pp.231–274.
- [4] E. Commission. Standard Eurobarometer 91 Spring 2019 First results Public opinion in the European Union June 2019 Survey requested and co-ordinated by the European Commission , Standard Eurobarometer 91 First results Public opinion in the European Union, **2019**.
- [5] European Commission. “Action Plan to enhance preparedness against chemical, biological, radiological and nuclear security risk” *Com.* **2017**, Vol. 18 (10), pp.16. https://ec.europa.eu/home-affairs/sites/homeaffairs/files/what-we-do/policies/european-agenda-security/20171018_action_plan_to_enhance_preparedness_against_chemical_biological_radiological_and_nuclear_security_risks_en.pdf.
- [6] “Agri-environmental indicators.” https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agri-environmental_indicators (accessed September 20, 2019).
- [7] A. Hakonen, P.O. Andersson, M. Stenbæk Schmidt, T. Rindzevicius, M. Käll. “Explosive and chemical threat detection by surface-enhanced Raman scattering: A review” *Anal. Chim. Acta.* **2015**, Vol. 893 pp.1–13.
- [8] S.R. Emory, S. Nie. “Near-Field Surface-Enhanced Raman Spectroscopy on Single Silver Nanoparticles” *Anal. Chem.* **1997**, Vol. 69 (14), pp.2631–2635.
- [9] E.J. Blackie, E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin. “Single-molecule surface-enhanced raman spectroscopy of nonresonant molecules” *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, Vol. 131 (40), pp.14466–14472.
- [10] “The International Forum to Advance First Responder Innovation. Capability Gap 3 ‘Deep Dive’ Analysis Synopsis” **2018**,. https://www.internationalresponderforum.org/sites/default/files/1ckfrer4m_16447_0_0.pdf.
- [11] M. Lafuente, D. Sanz, M.A. Urbiztondo, J. Santamaría, M.P. Pina, R. Mallada. “Gas phase detection of Chemical Warfare Agents CWAs with portable Raman” *J. Hazard. Mater.* **2020**, Vol. 384 pp.121279.
- [12] “Chemical Weapons Convention | OPCW.” <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention> (accessed June 8, 2020).
- [13] Y. Sun, K. Ong. *Detection Technologies for Chemical Warfare Agents and Toxic Vapors*, **2010**.
- [14] “Acute Exposure Guideline Levels for Airborne Chemicals” **2019**,. <https://www.epa.gov/aegl>.

- [15] P. Gattinesi. European Reference Network for Critical Infrastructure Protection ERNCIP handbook 2018 edition., **2018**.
- [16] “Plant Production and Protection Division: Página de estándares para especificaciones de plaguicidas y control de calidad.” <http://www.fao.org/agriculture/crops/mapa-tematica-del-sitio/theme/pests/jmps/es/> (accessed June 8, 2020).
- [17] “Stockholm Convention - Home page.” <http://www.pops.int/> (accessed June 8, 2020).
- [18] R.C. Gilden, K. Huffling, B. Sattler. “Pesticides and Health Risks” *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* **2010**, Vol. 39 (1), pp.103–110.
- [19] European Union. “Commission Decision of 12 March 2003 concerning the non-inclusion of parathion-methyl in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance” *Off. J. Eur. Union.* **2003**, Vol. 67 (L18),.
- [20] “EU Pesticides database - European Commission.” <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1671> (accessed June 8, 2020).
- [21] H.-H. Perkampus. UV-VIS Spectroscopy and its Applications, Springer Science & Business Media., **2013**.
- [22] J.R. Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy, Springer Science & Business Media., **2013**.
- [23] N.B. Colthup, L.H. Daly, S.E. Wiberley. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Academic Press, Inc., New York, **1975**.
- [24] B.C. Smith. Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy, CRC press, **2011**.
- [25] J. Ferraro, K. Nakamoto. Introductory Raman spectroscopy, Elsevier, San Diego, **2003**.
- [26] G. Smith, Ewen Dent. Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach, John Wiley and Sons Inc., **2005**.
- [27] R.L. McCreery. Raman Spectroscopy for Chemical Analysis, John Wiley and Sons Inc., **2005**.
- [28] E. Le Ru, P.G. Etchegoin. Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects, 2009th ed., Elsevier, **2009**.
- [29] H. Schrotter, H.W. Klackner. Raman Scattering Cross Sections in Gases and Liquids, in: Springer (Ed.), Raman Spectrosc. Gases Liq., Berlin, **1979**: pp. 24–26.
- [30] M. Fleischmann, P. Hendra, A.J. McQuillan. “Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode” *Chem. Phys. Lett.* **1974**, Vol. 26 (2), pp.163–166.
- [31] M. Moskovits. “Surface-Enhanced spectroscopy” *Rev. Mod. Phys.* **1985**, Vol. 57 (3),.
- [32] A. Campion, P. Kambhampati. “Surface-enhanced raman scattering” *Chem. Soc. Rev.* **1998**, Vol. 27 pp.241–250.
- [33] R. Aroca. Surface-enhanced vibrational spectroscopy, John Wiley and Sons Inc., **2006**.
- [34] E.C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P.G. Etchegoint. “Surface enhanced raman scattering enhancement factors: A comprehensive study” *J. Phys. Chem. C.* **2007**, Vol. 111 (37),

- pp.13794–13803.
- [35] P.L. Stiles, J.A. Dieringer, N.C. Shah, R.P. Van Duyne. “Surface-enhanced Raman spectroscopy” *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, Vol. 1 pp.601–626.
- [36] L.M. Liz-Marzan, C.J. Murphy, J. Wang. “Nanoplasmonics” *Chem. Soc. Rev.* **2014**, Vol. 23 pp.3820–3822.
- [37] R. Ritchie. “Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films” *Phys. Rev.* **1957**, Vol. 106 (5),.
- [38] S.A. Maier. *Plasmonics: fundamentals and applications*, Springer Science & Business Media, **2007**.
- [39] K.A. Willets, R.P. Van Duyne. “Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing” *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2006**, Vol. 58 (1), pp.267–297.
- [40] E.D. Palik. *Handbook of Optical Constants of Solids. Volume III.*, Academic press, **1998**.
- [41] J.D. Jackson. *Classical electrodynamics*, John Wiley and Sons Inc., **2007**.
- [42] M.R. Querry. *Optical Constants, Report n.*, University of Missouri, Kansas City, **1985**.
- [43] P.B. Johnson, R. Christy. “Optical constants of the noble metals” *Phys. Rev. B.* **1972**, Vol. 6 (12), pp.4370.
- [44] F. Wang, Y.R. Shen. “General properties of local plasmons in metal nanostructures” *Phys. Rev. Lett.* **2006**, Vol. 97 (20), pp.206806.
- [45] A. Wokaun. “Surface enhancement of optical fields: mechanism and applications” *Mol. Phys.* **1985**, Vol. 56 (1),.
- [46] S.A. Asher. *Ultraviolet Raman Spectroscopy*, John Wiley and Sons Inc., **2002**.
- [47] B. Sharma, M.F. Cardinal, M.B. Ross, A.B. Zrimsek, S. V Bykov, D. Punihale, S.A. Asher, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne. “Aluminum Film-Over-Nanosphere Substrates for Deep-UV Surface- Enhanced Resonance Raman Spectroscopy” *Nano Lett.* **2016**,.
- [48] S.K. Jha, Z. Ahmed, M. Agio, Y. Ekinici. “Deep-UV Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering of Adenine on Aluminum Nanoparticle Arrays” *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, Vol. 134 pp.1966–1969.
- [49] E. Kämmer, T. Dörfer, A. Csáki, W. Schumacher, A.P. Da Costa Filho, N. Tarcea, W. Fritzsche, P. Rosch, M. Schmitt, J. Popp. “Evaluation of Colloids and Activation Agents for Determination of Melamine Using UV-SERS” *J. Phys. Chem. C.* **2012**, Vol. 116 pp.6083–6091.
- [50] D.O. Sigle, E. Perkins, J.J. Baumberg, S. Mahajan. “Reproducible Deep-UV SERRS on Aluminum Nanovoids” *J. Chem. Lett.* **2013**, Vol. 4 pp.1449–1452.
- [51] J. Langer, D. Jimenez de Aberasturi, J. Aizpurua, R.A. Alvarez-Puebla, B. Auguie, J.J. Baumberg, G.C. Bazan, S.E.J. Bell, A. Boisen, A.G. Brolo, et al. “Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering” *ACS Nano.* **2019**, Vol. 14 (1), pp.28–117.
- [52] C.F. Bohren, D.R. Huffman. *Absorption and scattering of light by small particles*, JOHN WILEY & SONS INC, **2008**.
- [53] N.J. Halas, S. Lal, W. Chang, S. Link, P. Nordlander. “Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures” *Chem. Rev.* **2011**, Vol. 111 pp.3913–3961.

- [54] J.V. Garcia-Ramos. "Mecanismo Electromagnético del efecto SERS" *Óptica Pura y Apl.* **2004**, Vol. 37 (2), pp.17–22.
- [55] W. Suetaka. Surface infrared and Raman spectroscopy: methods and applications, Springer Science & Business Media, **2013**.
- [56] W. Fritzsche, J. Popp. Optical nano-and microsystems for bioanalytics, Springer Science & Business Media, **2012**.
- [57] M. Moskovits. "Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective" *J. Raman Spectrosc.* **2005**, Vol. 36 (6), pp.485–496.
- [58] R.F. Aroca, M. Campos-Vallette, J.V. Garcia-Ramos. Amplificación plasmónica de espectros Raman y de fluorescencia: SERS y SEF sobre nanoestructuras metálicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), **2014**.
- [59] B.J. Kennedy, S. Spaeth, M. Dickey, K.T. Carron. "Determination of the distance dependence and experimental effects for modified SERS substrates based on self-assembled monolayers formed using alkanethiols" *J. Phys. Chem. B.* **1999**, Vol. 103 (18), pp.3640–3646.
- [60] K. Katrin, K. Harald, I. Irving, R.D. Ramachandra, S.F. Michael. "Surface-enhanced Raman scattering and biophysics" *J. Phys. Condens. Matter.* **2002**, Vol. 14 (18), pp.R597.
- [61] M. Moskovits, J.. Suh. "Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver" *J. Phys. Chem.* **1984**, Vol. 88 (23), pp.5526–5530.
- [62] J.A. Creighton. "The effective Raman tensor for SER scattering by molecules adsorbed at the surface of a spherical particle" *Surf. Sci.* **1985**, Vol. 158 pp.211–221.
- [63] A.G. Brolo, D.E. Irish, B.D. Smith. "Applications of surface enhanced Raman scattering to the study of metal-adsorbate interactions" *J. Mol. Struct.* **1997**, Vol. 405 (1), pp.29–44.
- [64] F. Avila, C. Ruano, I. Lopez-Tocon, J.F. Arenas, J. Soto, J.C. Otero. "How the electrode potential controls the selection rules of the charge transfer mechanism of SERS" *Chem. Commun.* **2011**, (14),.
- [65] I. Lopez-Tocon, S.P. Centeno, J.C. Otero, J.. Marcos. "Selection rules for the charge transfer enhancement mechanism in SERS: dependence of the intensities on the L-matrix" *J. Mol. Struct.* **2001**, Vol. 565 pp.369–372.
- [66] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhom, W. Akemann. "Surface-enhanced Raman scattering" *J. Phys. Condens. Matter.* **1992**, Vol. 4 (5), pp.1143.
- [67] D.Y. Wu, X.M. Liu, S. Duan, X. Xu, B. Ren, S.H. Lin, Z.. Tian. "Chemical enhancement effects in SERS spectra: a quantum chemical study of pyridine interacting with copper, silver, gold and platinum metals" *J. Phys. Chem. C.* **2008**, Vol. 112 (11), pp.4195–4204.
- [68] L. Jensen, C.. Aikens, G.C. Schatz. "Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering" *Chem. Soc. Rev.* **2008**, Vol. 37 (5), pp.1061–1073.
- [69] A. Otto, J. Billman, J. Eickmans, U. Ertürk, C. Pettenkofer. "The 'adatom model' of SERS (surface enhanced Raman scattering): the present status" *Surf. Sci.* **1984**, Vol. 132 (2–3), pp.319–338.
- [70] M.F. Cardinal, E. Vander Ende, R.A. Hackler, M.O. McAnally, P.C. Stair, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne. "Expanding applications of SERS through versatile nanomaterials

- engineering” *Chem. Soc. Rev.* **2017**, Vol. 46 (13), pp.3886–3903.
- [71] B. Sharma, R.R. Frontiera, A.I. Henry, E. Ringe, R.P. Van Duyne. “SERS: Materials, applications, and the future” *Mater. Today.* **2012**, Vol. 15 (1–2), pp.16–25.
- [72] B. Sharma, M.F. Cardinal, S.L. Kleinman, N.G. Greeneltch, R.R. Frontiera, M.G. Blaber, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne. “High-performance SERS substrates: Advances and challenges” *MRS Bull.* **2013**, Vol. 38 (8), pp.615–624.
- [73] R. Tantra, R.J. Brown, M.J. Milton. “Strategy to improve the reproducibility of colloidal SERS” *J. Raman Spectrosc.* **2007**, Vol. 38 (11), pp.1469–1479.
- [74] M. Fan, G.F.S. Andrade, A.G. Brolo. “A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry” *Anal. Chim. Acta.* **2011**, Vol. 693 (1–2), pp.7–25.
- [75] M. Fan, G.F.S. Andrade, A.G. Brolo. “A review on recent advances in the applications of surface-enhanced Raman scattering in analytical chemistry” *Anal. Chim. Acta.* **2020**, Vol. 1097 pp.1–29.
- [76] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S.E. Skrabalak. “Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? Angewandte” *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, Vol. 48 pp.60–103.
- [77] J.P. Camden, J.A. Dieringer, J. Zhao, R.P. Van Duyne. “Controlled Plasmonic Nanostructures for Surface-Enhanced Spectroscopy and Sensing” *Acc. Chem. Res.* **2008**, Vol. 41 (12), pp.1653–1661.
- [78] F. Hao, C.L. Nehl, J.H. Hafner, P. Nordlander. “Plasmon resonances of a gold nanostar” *Nano Lett.* **2007**, Vol. 7 (3), pp.729–732.
- [79] A.X. Wang, X. Kong. “Review of Recent Progress of Plasmonic Materials and Nano-Structures for Surface-Enhanced Raman Scattering” *Materials (Basel).* **2015**, Vol. 8 pp.3024–3052.
- [80] G. Das, E. Battista, G. Manzo, F. Causa, P.A. Netti, E. Di Fabrizio. “Large-Scale Plasmonic nanoCones Array for Spectroscopy Detection” *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2015**, Vol. 7 (42), pp.23597–23604.
- [81] J.M. Kontio, J. Simonen, J. Tommila, M. Pessa. “Arrays of metallic nanocones fabricated by UV-nanoimprint lithography” *Microelectron. Eng.* **2010**, Vol. 87 (9), pp.1711–1715.
- [82] P. Senthil Kumar, I. Pastoriza-Santos, B. Rodríguez-González, F. Javier García De Abajo, L.M. Liz-Marzán. “High-yield synthesis and optical response of gold nanostars” *Nanotechnology.* **2008**, Vol. 19 (1), pp.1–7.
- [83] K.J. Major, C. De, S.O. Obare. “Recent Advances in the Synthesis of Plasmonic Bimetallic Nanoparticles” *Plasmonics.* **2009**, Vol. 4 pp.61–78.
- [84] A. Zaleska-Medynska, M. Marchelek, M. Diak, E. Grabowska. “Noble metal-based bimetallic nanoparticles: the effect of the structure on the optical, catalytic and photocatalytic properties” *Adv. Colloid Interface Sci.* **2016**, Vol. 229 pp.80–107.
- [85] R. Borah, S.W. Verbruggen. “Silver – Gold Bimetallic Alloy versus Core – Shell Nanoparticles: Implications for Plasmonic Enhancement and Photothermal Applications” *J. Phys. Chem. C.* **2020**,.
- [86] G. Sharma, A. Kumar, S. Sharma, M. Naushad, R. Prakash, Z.A. Alothman, G. Tessema.

- “Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites : A review” *J. King Saud Univ. - Sci.* **2019**, Vol. 31 (2), pp.257–269.
- [87] D. Rioux, S. Vallières, S. Besner, P. Muñoz, E. Mazur, M. Meunier. “An Analytic Model for the Dielectric Function of Au, Ag, and their Alloys” *Adv. Opt. Mater.* **2014**, Vol. 2 pp.176–182.
- [88] E. Prodan, C. Radloff, N.J. Halas, P. Nordlander. “A Hybridization Model for the Plasmon Response of complex nanostructures” *Science (80-.)*. **2003**, Vol. 302 (5644), pp.419–423.
- [89] A. Pyatenko, M. Yamaguchi, M. Suzuki. “Synthesis of Spherical Silver Nanoparticles with Controllable Sizes in Aqueous Solutions” *J. Phys. Chem. C.* **2007**, Vol. 111 (22), pp.7910–7917.
- [90] S.D. Perrault, W.C.W. Chan. “Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50–200 nm” *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, Vol. 132 (33), pp.11824.
- [91] D. Steinigeweg, S. Schlücker. “Monodispersity and size control in the synthesis of 20–100 nm quasi-spherical silver nanoparticles by citrate and ascorbic acid reduction in glycerol–water mixtures” *Chem. Commun.* **2012**, Vol. 48 pp.8682–8684.
- [92] C.D. De Souza, B.R. Nogueira, M.E.C.M. Rostelato. “Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction” *J. Alloys Compd.* **2019**, Vol. 798 pp.714–740.
- [93] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech. “Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited” *J. Phys. Chem. B.* **2006**, Vol. 110 (32), pp.15700–15707.
- [94] K. Bankura, D. Maity, M.R. Mollick, D. Mondal, B. Bhowmick, I. Roy, T. Midya, J. Sarkar, D. Rana, K. Acharya, et al. “Antibacterial activity of Ag–Au alloy NPs and chemical sensor property of Au NPs synthesized by dextran” *Carbohydr. Polym.* **2014**, Vol. 107 pp.151–157.
- [95] M.M. Kumari, J. Jacob, D. Philip. “Green synthesis and applications of Au–Ag bimetallic nanoparticles” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, Vol. 137 pp.185–192.
- [96] S. Link, Z.L. Wang, M.A. El-Sayed. “Alloy formation of gold-silver nanoparticles and the dependence of the plasmon absorption on their composition” *J. Phys. Chem. B.* **1999**, Vol. 103 (18), pp.3529–3533.
- [97] R. Sato-Berru, R. Redón, A. Vazquez-Olmos, J.M. Saniger. “Silver nanoparticles synthesized by direct photoreduction of metal salts. Application in surface-enhanced Raman spectroscopy” *J. Raman Spectrosc.* **2009**, Vol. 40 pp.376–380.
- [98] K.L. Mcgilvray, M.R. Decan, D. Wang, J.C. Scaiano. “Facile Photochemical Synthesis of Unprotected Aqueous Gold Nanoparticles” *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, Vol. 128 pp.15980–15981.
- [99] S. Mandal, P.R. Selvakannan, R. Pasricha, M. Sastry. “Keggin ions as UV-switchable reducing agents in the synthesis of Au core-Ag shell nanoparticles” *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, Vol. 125 (28), pp.8440–8441.
- [100] Y. Wan, Z. Guo, X. Jiang, K. Fang, X. Lu, Y. Zhang, N. Gu. “Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee–Meisel method” *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, Vol. 394 pp.263–268.

- [101] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy. "Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template" *Adv. Mater.* **2001**, Vol. 13 (18), pp.1389–1393.
- [102] J. Niu, T. Zhu, Z. Liu. "One-step seed-mediated growth of 30–150 nm quasispherical gold nanoparticles with 2-mercaptosuccinic acid as a new reducing agent" *Nanotechnology.* **2007**, Vol. 18 (32), pp.325607.
- [103] S. Pyne, P. Sarkar, S. Basu, G.P. Sahoo, D.K. Bhui, H. Bar, A. Misra. "Synthesis and photo physical properties of Au @ Ag (core @ shell) nanoparticles disperse in poly vinyl alcohol matrix" *J. Nanoparticle Resarch.* **2010**, Vol. 13 pp.1759–1767.
- [104] Z. Zhang, K. Bando, A. Taguchi, K. Mochizuki, K. Sato, H. Yasuda, K. Fujita, S. Kawata. "Au-Protected Ag Core/Satellite Nanoassemblies for Excellent Extra-/ Intracellular Surface-Enhanced Raman Scattering Activity" *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2017**, Vol. 9 pp.44027–44037.
- [105] N.R. Jana. "Gram-Scale Synthesis of Soluble , Near-Monodisperse Gold Nanorods and Other Anisotropic Nanoparticles" *Small.* **2005**, Vol. 1 (8–9), pp.875–882.
- [106] M.R.K. Ali, B. Snyder, M.A. El-sayed. "Synthesis and Optical Properties of Small Au Nanorods Using a Seedless Growth Technique" *Langmuir.* **2012**, Vol. 28 pp.9807–9815.
- [107] L. Zhang, K. Xia, Z. Lu, G. Li, J. Chen, Y. Deng, S. Li, F. Zhou, N. He. "Efficient and facile synthesis of gold nanorods with finely tunable plasmonic peaks from visible to near-IR range" *Chem. Mater.* **2014**, Vol. 26 (5), pp.1794–1798.
- [108] B.Y. Zhou, S.H. Yu, C.Y. Wang, X.G. Li. "A Novel Ultraviolet Irradiation Photoreduction Technique for the Preparation of Single-Crystal Ag Nanorods and Ag Dendrites" *Adv. Mater.* **1999**, Vol. 11 (10), pp.850–852.
- [109] F. Kim, J.H. Song, P. Yang. "Photochemical Synthesis of Gold Nanorods" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, Vol. 124 pp.14316–14317.
- [110] J. Jiu, K. Murai, D. Kim, K. Kim, K. Suganuma. "Preparation of Ag nanorods with high yield by polyol process" *Mater. Chem. Phys.* **2009**, Vol. 114 (1), pp.333–338.
- [111] B. Nikoobakht, M.A. El-Sayed. "Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) using seed-mediated growth method" *Chem. - A Eur. J.* **2013**, Vol. 15 pp.1957–1962.
- [112] A. Gole, C.J. Murphy. "Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods: Role of the Size and Nature of the Seed" *Chem. Mater.* **2004**, Vol. 16 (19), pp.3633–3640.
- [113] C.J. Murphy, L.B. Thompson, D.J. Chernak, J. An Yand, S.T. Sivapalan, S.P. Boulos, J. Huang, A.M. Alkilany, P.N. Sisco. "Gold nanorod crystal growth: From seed-mediated synthesis to nanoscale sculpting" *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, Vol. 16 (2), pp.128–164.
- [114] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, P. Mulvaney. "Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications" *Coord. Chem. Rev.* **2005**, Vol. 249 (17-18 SPEC. ISS.), pp.1870–1901.
- [115] S. Jayabal, R. Ramaraj. "Bimetallic Au / Ag nanorods embedded in functionalized silicate sol – gel matrix as an efficient catalyst for nitrobenzene reduction" *Appl. Catal. A, Gen.* **2014**, Vol. 470 pp.369–375.
- [116] N. Zhou, L. Polavarapu, N. Gao, Y. Pan, P. Yuan, Q. Wang, Q.H. Xu. "TiO₂

- coated Au/Ag nanorods with enhanced photocatalytic activity under visible light irradiation” *Nanoscale*. **2013**, Vol. 5 (10), pp.4236–4241.
- [117] E.C. Garnett, W. Cai, J.J. Cha, F. Mahmood, S.T. Connor, M.G. Christoforo, Y. Cui, M.D. McGehee, M.L. Brongersma. “Self-limited plasmonic welding of silver nanowire junctions” *Nat. Mater.* **2012**, Vol. 11 (3), pp.241–249.
- [118] Y. Sun, Y. Xia. “Large-Scale Synthesis of Uniform Silver Nanowires Through a Soft, Self-Seeding, Polyol Process” *Adv. Mater.* **2002**, Vol. 14 (11), pp.833–837.
- [119] X. Hou, X. Zhang, S. Chen, Y. Fang, N. Li, X. Zhai, Y. Liu. “Size-controlled synthesis of Au nanoparticles and nanowires and their application as SERS substrates” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, Vol. 384 (1–3), pp.345–351.
- [120] Y. Sun, Y. Yin, B.T. Mayers, T. Herricks, Y. Xia. “Uniform Silver Nanowires Synthesis by Reducing AgNO₃ with Ethylene Glycol in the Presence of Seeds and Poly (Vinyl Pyrrolidone)” *Chem. Mater.* **2002**, Vol. 14 (6), pp.4736–4745.
- [121] A. Garcia-Leis, J.V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes. “Silver nanostars with high SERS performance” *J. Phys. Chem. C*. **2013**, Vol. 117 (15), pp.7791–7795.
- [122] A. Guerrero-Martínez, S. Barbosa, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán. “Nanostars shine bright for you. Colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, Vol. 16 (2), pp.118–127.
- [123] A. Pangdam, K. Wongravee, S. Nootchanat, S. Ekgasit. “Urchin-like gold microstructures with tunable length of nanothorns” *Mater. Des.* **2017**, Vol. 130 (February), pp.140–148.
- [124] L.C. Cheng, J.H. Huang, H.M. Chen, T.C. Lai, K.Y. Yang, R.S. Liu, M. Hsiao, C.H. Chen, L.J. Her, D.P. Tsai. “Seedless, silver-induced synthesis of star-shaped gold/silver bimetallic nanoparticles as high efficiency photothermal therapy reagent” *J. Mater. Chem.* **2012**, Vol. 22 (5), pp.2244–2253.
- [125] L. Lu, A. Kobayashi, K. Tawa, Y. Ozaki. “Silver Nanoplates with Special Shapes: Controlled Synthesis and Their Surface Plasmon Resonance and Surface-Enhanced Raman Scattering Properties” *Chem. Mater.* **2006**, Vol. 18 (20), pp.4894–4901.
- [126] S. Barbosa, A. Agrawal, L. Rodríguez-Lorenzo, I. Pastoriza-Santos, R.A. Alvarez-Puebla, A. Kornowski, H. Weller, L.M. Liz-Marzán. “Tuning size and sensing properties in colloidal gold nanostars” *Langmuir*. **2010**, Vol. 26 (18), pp.14943–14950.
- [127] N.I. Evcimen, S. Coskun, D. Kozanoglu, G. Ertas, H.E. Unalan, E. Nalbant Esenturk. “Growth of branched gold nanoparticles on solid surfaces and their use as surface-enhanced Raman scattering substrates” *RSC Adv.* **2015**, Vol. 5 (123), pp.101656–101663.
- [128] C. Xing, S. Zhong, J. Yu, X. Li, A. Cao. “Two-dimensional flower-shaped Au@Ag nanoparticle array as effective SERS substrate with high sensitivity and reproducibility for detection of thiram” *J. Mater. Chem. C*. **2020**, Vol. 8 pp.3838–3845.
- [129] A.M. Fales, H. Yuan, T. Vo-Dinh. “Development of hybrid silver-coated gold nanostars for nonaggregated surface-enhanced raman scattering” *J. Phys. Chem. C*. **2014**, Vol. 118 (7), pp.3708–3715.
- [130] A. Garcia-Leis, A. Torreggiani, J.V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes. “Hollow Au/Ag nanostars displaying broad plasmonic resonance and high surface-enhanced Raman sensitivity” *Nanoscale*. **2015**, Vol. 7 (32), pp.13629–13637.
- [131] A.J. Frank, N. Cathcart, K.E. Maly, V. Kitaev. “Synthesis of silver nanoprisms with

- variable size and investigation of their optical properties: A first-year undergraduate experiment exploring plasmonic nanoparticles” *J. Chem. Educ.* **2010**, Vol. 87 (10), pp.1098–1101.
- [132] S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry. “Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract” *Biotechnol. Prog.* **2006**, Vol. 22 (2), pp.577–583.
- [133] B. Ankamwar, M. Chaudhary, M. Sastry. “Gold Nanotriangles Biologically Synthesized using Tamarind Leaf Extract and Potential Application in Vapor Sensing” *J. Synth. React. Inorganic, Met. Nano-Metal Chem.* **2005**, Vol. 35 (1), pp.19–26.
- [134] A. Rai, A. Singh, A. Ahmad, M. Sastry. “Role of Halide Ions and Temperature on the Morphology of Biologically Synthesized Gold Nanotriangles” *Langmuir.* **2006**, Vol. 22 (2), pp.736–741.
- [135] J. An, B. Tang, X. Ning, J. Zhou, B. Zhao, W. Xu, C. Corredor, J. R. Lombardi. “Photoinduced Shape Evolution: From Triangular to Hexagonal Silver Nanoplates” *J. Phys. Chem. C.* **2007**, Vol. 111 (49), pp.18055–18059.
- [136] H. Liu, T. Liu, L. Zhang, L. Han, C. Gao, Y. Yin. “Etching-Free Epitaxial Growth of Gold on Silver Nanostructures for High Chemical Stability and Plasmonic Activity” *Adv. Funct. Mater.* **2015**, Vol. 25 pp.5435–5443.
- [137] A. Tao, P. Sinsersuksakul, P. Yang. “Polyhedral Silver Nanocrystals with Distinct Scattering Signatures” *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, Vol. 45 pp.4597–4601.
- [138] H.I. Sang, T.L. Yun, B. Wiley, Y. Xia. “Large-scale synthesis of silver nanocubes: The role of HCl in promoting cube perfection and monodispersity” *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, Vol. 44 (14), pp.2154–2157.
- [139] H. Wu, H. Tsai, Y. Hung, K. Lao, C. Liao, P. Chung, J. Huang, I. Chen, M.H. Huang. “A Comparative Study of Gold Nanocubes, Octahedra, and Rhombic Dodecahedra as Highly Sensitive SERS Substrates” *Inorg. Chem.* **2011**, Vol. 50 pp.8106–8111.
- [140] W. Niu, S. Zheng, D. Wang, X. Liu, H. Li. “Selective Synthesis of Single-Crystalline Rhombic Dodecahedral, Octahedral, and Cubic Gold Nanocrystals” *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, Vol. 131 pp.697–703.
- [141] Q. Zhang, W. Li, C. Moran, J. Zeng, J. Chen, L.-P. Wen, Y. Xia. “Seed-Mediated Synthesis of Ag Nanocubes with Controllable Edge Lengths in the Range of 30–200 nm and Comparison of Their Optical Properties” *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, Vol. 132 (32), pp.11372–11378.
- [142] H.L. Wu, C.-H. Kuo, M.H. Huang. “Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanocrystals with Systematic Shape Evolution from Cubic to Trisectahedral and Rhombic Dodecahedral Structures” *Langmuir.* **2010**, Vol. 26 (14), pp.12307–12313.
- [143] Y. Ma, W. Li, W.C. Cho, Z. Li, T. Yu, J. Zeng, Z. Xie, Y. Xia. “Au@Ag Core–Shell Nanocubes with Finely Tuned and Well-Controlled Sizes, Shell Thicknesses, and Optical Properties” *ACS Nano.* **2010**, Vol. 4 (11), pp.6725–6734.
- [144] Y. Yang, J. Liu, Z. Fu, D. Qin. “Galvanic Replacement-Free Deposition of Au on Ag for Core – Shell Nanocubes with Enhanced Chemical Stability and SERS Activity” *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, Vol. 136 pp.8153–8156.
- [145] E.A. Sutter, P.W. Sutter. “In situ liquid cell electron microscopy of Ag–Au galvanic replacement reactions” *Nanoscale.* **2017**, Vol. 9 pp.1271–1278.

- [146] T. Zhang, F. Zhou, L. Hang, Y. Sun, D. Liu, H. Li, G. Liu, X. Lyu, C. Li, W. Cai, et al. "Controlled synthesis of sponge-like porous Au-Ag alloy nanocubes for surface-enhanced Raman scattering properties" *J. Mater. Chem. C* **2017**, Vol. 5 (42), pp.11039–11045.
- [147] E. Carbó-Argibay, B. Rodríguez-Gonzalez, J. Pacifico, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, L.M. Liz-Marzan. "Sharpening of Gold Nanorods : The Rod-to-Octahedron Transition" *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, Vol. 46 pp.8983–8983.
- [148] G.H. Jeong, M. Kim, Y.W. Lee, W. Choi, W.T. Oh, Q. Park, S.W. Han. "Polyhedral Au Nanocrystals Exclusively Bound by { 110 } Facets : The Rhombic Dodecahedron" *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, Vol. 131 pp.1672–1673.
- [149] B. Pietrobon, V. Kitaev, R. V April, V. Re, M. Recci, V. May. "Photochemical Synthesis of Monodisperse Size-Controlled Silver Decahedral Nanoparticles and Their Remarkable Optical Properties" *Chem. Mater.* **2008**, (22), pp.5186–5190.
- [150] X. Zheng, X. Zhao, D. Guo, B. Tang, S. Xu, B. Zhao, W. Xu, C. Corredor, J. Lombardi. "Photochemical Formation of Silver Nanodecahedra: Structural Selection by the Excitation Wavelength" *Langmuir*. **2009**, Vol. 25 (6), pp.3802–3807.
- [151] C.-H. Kuo, C. Chen, M.H. Huang. "Seed-Mediated Synthesis of Monodispersed Cu₂O Nanocubes with Five Different Size Ranges from 40 to 420 nm" *Adv. Funct. Mater.* **2007**, Vol. 17 (18), pp.3773–3780.
- [152] M.S. Shore, J. Wang, A.C. Johnston-peck, A.L. Oldenburg, J.B. Tracy. "Synthesis of Au (Core) / Ag (Shell) Nanoparticles and their Conversion to AuAg Alloy Nanoparticles" *Small*. **2011**, Vol. 7 (2), pp.230–234.
- [153] C. Wang, S. Peng, R. Chan, S. Sun. "Synthesis of AuAg Alloy Nanoparticles from Core / Shell- Structured Ag / Au" *Small*. **2009**, Vol. 5 (5), pp.567–570.
- [154] W. Xi, B.K. Shrestha, A.J. Haes. "Promoting Intra- and Intermolecular Interactions in Surface-Enhanced Raman Scattering" *Anal. Chem.* **2018**, Vol. 90 pp.128–143.
- [155] A. Shiohara, Y. Wang, L.M. Liz-marzán. "Recent approaches toward creation of hot spots for SERS detection" *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2014**, Vol. 21 pp.2–25.
- [156] R.G. Freeman, K.C. Grabar, K.J. Allison, R.M. Bright, J.A. Davis, A.P. Guthrie, M.B. Hommer, M.A. Jackson, P.C. Smith, D.G. Walter, et al. "Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates" *Science (80-)*. **1995**, Vol. 267 (5204), pp.1629–1632.
- [157] C.J. Addison, A.G. Brolo. "Nanoparticle-containing structures as a substrate for surface-enhanced Raman scattering" *Langmuir*. **2006**, Vol. 22 (21), pp.8696–8702.
- [158] G.F.S. Andrade, M. Fan, A.G. Brolo. "Multilayer silver nanoparticles-modified optical fiber tip for high performance SERS remote sensing" *Biosens. Bioelectron.* **2010**, Vol. 25 (10), pp.2270–2275.
- [159] Q. Su, X. Ma, J. Dong, C. Jiang, W. Qian. "A reproducible SERS substrate based on electrostatically assisted aptes-functionalized surface-assembly of gold nanostars" *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2011**, Vol. 3 (6), pp.1873–1879.
- [160] L. Rodríguez-Lorenzo, R.A. Álvarez-Puebla, I. Pastoriza-Santos, S. Mazzucco, O. Stéphan, M. Kociak, L.M. Liz-Marzán, F.J.G. De Abajo. "Zeptomol detection through controlled ultrasensitive surface-enhanced raman scattering" *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, Vol. 131 (13), pp.4616–4618.

- [161] G. Lu, H. Li, H. Zhang. “Nanoparticle-coated PDMS elastomers for enhancement of Raman scattering” *Chem. Commun.* **2011**, Vol. 47 (30), pp.8560–8562.
- [162] A. Shiohara, J. Langer, L. Polavarapu, L.M. Liz-Marzán. “Solution processed polydimethylsiloxane/gold nanostar flexible substrates for plasmonic sensing” *Nanoscale.* **2014**, Vol. 6 (16), pp.9817–9823.
- [163] N. P. W. Pieczonka, P. J. G. Goulet, R. F. Aroca. “Chemically Selective Sensing through Layer-by-Layer Incorporation of Biorecognition into Thin Film Substrates for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering” *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, Vol. 128 (39), pp.12626–12627.
- [164] J.B. Jackson, N.J. Halas. “Surface-enhanced Raman scattering on tunable plasmonic nanoparticle substrates” *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, Vol. 101 (52), pp.17930–17935.
- [165] H.-W. Cheng, S.-Y. Huan, H.-L. Wu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu. “Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Detection of a Bacteria Biomarker Using Gold Nanoparticle Immobilized Substrates” *Anal. Chem.* **2009**, Vol. 81 (24), pp.9902–9912.
- [166] X. Hu, W. Cheng, T. Wang, Y. Wang, E. Wang, S. Dong. “Fabrication, Characterization, and Application in SERS of Self-Assembled Polyelectrolyte–Gold Nanorod Multilayered Films” *J. Phys. Chem. B.* **2005**, Vol. 109 (41), pp.19385–19389.
- [167] K. Kim, H. Bong Lee, J. Won Lee, H. Kun Park, K. Soo Shin. “Self-Assembly of Poly(ethylenimine)-Capped Au Nanoparticles at a Toluene–Water Interface for Efficient Surface-Enhanced Raman Scattering” *Langmuir.* **2008**, Vol. 24 (14), pp.7178–7183.
- [168] J. Lee, B. Hua, S. Park, M. Ha, Y. Lee, Z. Fan, H. Ko. “Tailoring surface plasmons of high-density gold nanostar assemblies on metal films for surface-enhanced Raman spectroscopy” *Nanoscale.* **2014**, Vol. 6 (1), pp.616–623.
- [169] X. Li, W. Xu, J. Zhang, H. Jia, B. Yang, B. Zhao, B. Li, Y. Ozaki. “Self-Assembled Metal Colloid Films: Two Approaches for Preparing New SERS Active Substrates” *Langmuir.* **2004**, Vol. 20 (4), pp.1298–1304.
- [170] S. Abalde-Cela, S. Ho, B. Rodríguez-González, M.A. Correa-Duarte, R.A. Álvarez-Puebla, L.M. Liz-Marzán, N.A. Kotov. “Loading of exponentially grown LBL films with silver nanoparticles and their application to generalized SERS detection” *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, Vol. 48 (29), pp.5326–5329.
- [171] P. J. G. Goulet, D. S. dos Santos, R. A. Alvarez-Puebla, O. N. Oliveira, R. F. Aroca. “Surface-Enhanced Raman Scattering on Dendrimer/Metallic Nanoparticle Layer-by-Layer Film Substrates” *Langmuir.* **2005**, Vol. 21 (12), pp.5576–5581.
- [172] R. F. Aroca, P. J. G. Goulet, D. S. dos Santos, R. A. Alvarez-Puebla, O. N. Oliveira. “Silver Nanowire Layer-by-Layer Films as Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering” *Anal. Chem.* **2004**, Vol. 77 (2), pp.378–382.
- [173] H. Wang, J. Kundu, N.J. Halas. “Plasmonic nanoshell arrays combine surface-enhanced vibrational spectroscopies on a single substrate” *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, Vol. 46 (47), pp.9040–9044.
- [174] M. N. Martin, J. I. Basham, P. Chando, S.-K. Eah. “Charged Gold Nanoparticles in Non-Polar Solvents: 10-min Synthesis and 2D Self-Assembly” *Langmuir.* **2010**, Vol. 26 (10), pp.7410–7417.
- [175] A. Cerf, G. Molnár, C. Vieu. “Novel Approach for the Assembly of Highly Efficient SERS Substrates” *ACS Appl. Mater. & Interfaces.* **2009**, Vol. 1 (11), pp.2544–2550.

- [176] S. Acharya, J.P. Hill, K. Ariga. “Soft langmuir-blodgett technique for hard nanomaterials” *Adv. Mater.* **2009**, Vol. 21 (29), pp.2959–2981.
- [177] M. Lafuente, S. Ruiz-Rincón, R. Mallada, P. Cea, M. Pilar Pina. “Towards the reproducible fabrication of homogeneous SERS substrates by Langmuir-Schaefer technique: A low cost and scalable approach for practical SERS based sensing applications” *Appl. Surf. Sci.* **2019**, (October), pp.144663.
- [178] C.S.L. Koh, H.K. Lee, X. Han, H.Y.F. Sim, X.Y. Ling. “Plasmonic nose: Integrating the MOF-enabled molecular preconcentration effect with a plasmonic array for recognition of molecular-level volatile organic compounds” *Chem. Commun.* **2018**, Vol. 54 (20), pp.2546–2549.
- [179] A. R. Tao, J. Huang, P. Yang. “Langmuir–Blodgettry of Nanocrystals and Nanowires” *Acc. Chem. Res.* **2008**, Vol. 41 (12), pp.1662–1673.
- [180] T. Schneller, R. Waser, M. Kosec, D. Payne. *Chemical Solution Deposition of Functional Oxide Thin Films*, Springer Vienna, **2013**.
- [181] A.G. Emslie, F.. Bonner, P. L.G. “Flow of a viscous liquid on a rotating disk” *J. Appl. Phys.* **1958**, Vol. 29 pp.858–862.
- [182] P. Colson, R. Cloots, C. Henrist. “Experimental Design Applied to Spin Coating of 2D Colloidal Crystal Masks: A Relevant Method?” *Langmuir.* **2011**, Vol. 27 (21), pp.12800–12806.
- [183] J. Chen, P. Dong, D. Di, C. Wang, H. Wang, J. Wang, X. Wu. “Controllable fabrication of 2D colloidal-crystal films with polystyrene nanospheres of various diameters by spin-coating” *Appl. Surf. Sci.* **2013**, Vol. 270 pp.6–15.
- [184] Z. Yi, G. Niu, J. Luo, X. Kang, W. Yao, W. Zhang, Y. Yi, Y. Yi, X. Ye, T. Duan, et al. “Ordered array of Ag semishells on different diameter monolayer polystyrene colloidal crystals: An ultrasensitive and reproducible SERS substrate” *Sci. Rep.* **2016**, Vol. 6 (July), pp.1–11.
- [185] D. S. dos Santos, P. J. G. Goulet, N. P. W. Pieczonka, O. N. Oliveira,, R. F. Aroca. “Gold Nanoparticle Embedded, Self-Sustained Chitosan Films as Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering” *Langmuir.* **2004**, Vol. 20 (23), pp.10273–10277.
- [186] B. Fortuni, T. Inose, S. Uezono, S. Toyouchi, K. Umamoto, S. Sekine, Y. Fujita, M. Ricci, G. Lu, A. Masuhara, et al. “In situ synthesis of Au-shelled Ag nanoparticles on PDMS for flexible, long-life, and broad spectrum-sensitive SERS substrates” *Chem. Commun.* **2017**, Vol. 53 (82), pp.11298–11301.
- [187] B. Fortuni, Y. Fujita, M. Ricci, T. Inose, R. Aubert, G. Lu, J.A. Hutchison, J. Hofkens, L. Latterini, H. Uji-I. “A novel method for in situ synthesis of SERS-active gold nanostars on polydimethylsiloxane film” *Chem. Commun.* **2017**, Vol. 53 (37),.
- [188] A. Sánchez-Iglesias, P. Aldeanueva-Potel, W. Ni, J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, R.A. Alvarez-Puebla, B.N. Mbenkum, L.M. Liz-Marzán. “Chemical seeded growth of Ag nanoparticle arrays and their application as reproducible SERS substrates” *Nano Today.* **2010**, Vol. 5 (1), pp.21–27.
- [189] W. Joon Cho, Y. Kim, J. Kon Kim. “Ultrahigh-Density Array of Silver Nanoclusters for SERS Substrate with High Sensitivity and Excellent Reproducibility” *ACS Nano.* **2011**, Vol. 6 (1), pp.249–255.
- [190] Y.W. Wang, K.C. Kao, J.K. Wang, C.Y. Mou. “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**, Vol. 120 (42), pp.24382–24388.
- [191] V. López-Puente, S. Abalde-Cela, P.C. Angelomé, R.A. Alvarez-Puebla, L.M. Liz-Marzán. “Plasmonic mesoporous composites as molecular sieves for SERS detection” *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, Vol. 4 (16), pp.2715–2720.
- [192] P. Rajapandiyan, J. Yang. “Photochemical method for decoration of silver nanoparticles on filter paper substrate for SERS application” *J. Raman Spectrosc.* **2014**, Vol. 45 (7), pp.574–580.
- [193] X. Zheng, D. Guo, Y. Shao, S. Jia, S. Xu, B. Zhao, W. Xu, C. Corredor, J. R. Lombardi. “Photochemical Modification of an Optical Fiber Tip with a Silver Nanoparticle Film: A SERS Chemical Sensor” *Langmuir*. **2008**, Vol. 24 (8), pp.4394–4398.
- [194] X. Xie, H. Pu, D. Sun. “Recent advances in nanofabrication techniques for SERS substrates and their applications in food safety analysis” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, Vol. 58 (16), pp.1–14.
- [195] S. Luo, K. Sivashanmugan, J. Liao, C. Yao. “Nanofabricated SERS-active substrates for single-molecule to virus detection in vitro: A review” *Biosens. Bioelectron.* **2014**, Vol. 61 pp.232–240.
- [196] M. Kahl, E. Voges, S. Kostrewa, V. C, W. Hill. “Periodically structured metallic substrates for SERS” *Sensors Actuators, B Chem.* **1998**, Vol. 51 (1–3), pp.285–291.
- [197] M. Chirumamilla, A. Toma, A. Gopalakrishnan, G. Das, R.P. Zaccaria, R. Krahné, E. Rondanina, M. Leoncini, C. Liberale, F. De Angelis, et al. “3D Nanostar Dimers with a Sub-10-nm Gap for Single- / Few-Molecule Surface-Enhanced Raman Scattering” *Adv. Mater.* **2014**, Vol. 26 pp.2353–2358.
- [198] M. Tabatabaei, M. Najiminaini, K. Davieau, B. Kaminska, M. R. Singh, J. J. L. Carson, F. Lagugné-Labarthe. “Tunable 3D Plasmonic Cavity Nanosensors for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy with Sub-femtomolar Limit of Detection” *ACS Photonics*. **2015**, Vol. 2 (6), pp.752–759.
- [199] A. Gopalakrishnan, M. Chirumamilla, F. De Angelis, A. Toma, R. Proietti Zaccaria, R. Krahné. “Bimetallic 3D Nanostar Dimers in Ring Cavities: Recyclable and Robust Surface-Enhanced Raman Scattering Substrates for Signal Detection from Few Molecules” *ACS Nano*. **2014**, Vol. 8 (8), pp.7986–7994.
- [200] H.I. Smith, R. Menon, A. Patel, D. Chao, M. Walsh, G. Barbastathis. “Zone-plate-array lithography: A low-cost complement or competitor to scanning-electron-beam lithography” *Microelectron. Eng.* **2006**, Vol. 83 (4), pp.956–961.
- [201] C.-W. Chang, J.-D. Liao, A.-L. Shiau, C.-K. Yao. “Non-labeled virus detection using inverted triangular Au nano-cavities arrayed as SERS-active substrate” *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, Vol. 156 (1), pp.471–478.
- [202] C.-W. Chang, J.-D. Liao, Y.-Y. Lin, C.-C. Weng. “Detecting very small quantity of molecular probes in solution using nano-mechanically made Au-cavities array with SERS-active effect” *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, Vol. 153 (1), pp.271–276.
- [203] X. Zhang, W.J. Salcedo, M.M. Rahman, A.G. Brolo. “Surface-enhanced Raman scattering from bowtie nanoaperture arrays” *Surf. Sci.* **2018**, Vol. 676 pp.39–45.
- [204] P. Bharadwaj, B. Deutsch, L. Novotny. “Optical Antennas” *Adv. Opt. Photonics*. **2009**,

- Vol. 1 (3), pp.438–483.
- [205] A. Ahmed, R. Gordon. “Single Molecule Directivity Enhanced Raman Scattering using Nanoantennas” *Nano Lett.* **2012**, Vol. 12 (5), pp.2625–2630.
- [206] Q. Tao, S. Li, C. Ma, K. Liu, Q.-Y. Zhang. “A highly sensitive and recyclable SERS substrate based on Ag-nanoparticle-decorated ZnO nanoflowers in ordered arrays” *Dalt. Trans.* **2015**, Vol. 44 (7), pp.3447–3453.
- [207] Q. Zhang, Y.H. Lee, I.Y. Phang, C.K. Lee, X.Y. Ling. “Hierarchical 3D SERS Substrates Fabricated by Integrating Photolithographic Microstructures and Self-Assembly of Silver Nanoparticles” *Small.* **2014**, Vol. 10 (13), pp.2703–2711.
- [208] S. Yan, F. Chu, H. Zhang, Y. Yuan, Y. Huang, A. Liu, S. Wang, W. Li, S. Li, W. Wen. “Rapid, one-step preparation of SERS substrate in microfluidic channel for detection of molecules and heavy metal ions” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, Vol. 220 pp.117113.
- [209] R.K. Lauridsen, P.B. Skou, T. Rindzevicius, K. Wu, S. Molin, S.B. Engelsen, K.G. Nielsen, H.K. Johansen, A. Boisen. “SERS spectroscopy for detection of hydrogen cyanide in breath from children colonised with: *P. aeruginosa*” *Anal. Methods.* **2017**, Vol. 9 (39), pp.5757–5762.
- [210] M. Hu, F.S. Ou, W. Wu, I. Naumov, X. Li, A.M. Bratkovsky, R.S. Williams, Z. Li. “Gold nanofingers for molecule trapping and detection” *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, Vol. 132 (37), pp.12820–12822.
- [211] M.S. Schmidt, J. Hübner, A. Boisen. “Large area fabrication of leaning silicon nanopillars for Surface Enhanced Raman Spectroscopy” *Adv. Mater.* **2012**, Vol. 24 (10),.
- [212] P.J. Kelly, R.D. Arnell. “Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications” *Vacuum.* **2000**, Vol. 56 (3), pp.159–172.
- [213] Y. Yang, Z.-Y. Li, K. Yamaguchi, M. Tanemura, Z. Huang, D. Jiang, Y. Chen, F. Zhou, M. Nogami. “Controlled fabrication of silver nanoneedles array for SERS and their application in rapid detection of narcotics” *Nanoscale.* **2012**, Vol. 4 (8), pp.2663–2669.
- [214] M. Zhang, A. Zhao, D. Li, H. Sun, D. Wang, H. Guo, Q. Gao, Z. Gan, W. Tao. “Generalized green synthesis of diverse LnF₃-Ag hybrid architectures and their shape-dependent SERS performances” *RSC Adv.* **2014**, Vol. 4 (18), pp.9205–9212.
- [215] C. L. Haynes, R. P. Van Duyne. “Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics” *J. Phys. Chem. B.* **2001**, Vol. 105 (24), pp.5599–5611.
- [216] G. Zhang, D. Wang. “Colloidal Lithography—The Art of Nanochemical Patterning” *Chem. an Asian J.* **2009**, Vol. 4 (2), pp.236–245.
- [217] N. G. Greeneltch, M. G. Blaber, A.-I. Henry, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne. “Immobilized Nanorod Assemblies: Fabrication and Understanding of Large Area Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates” *Anal. Chem.* **2013**, Vol. 85 (4), pp.2297–2303.
- [218] K.B. Biggs, J.P. Camden, J.N. Anker, R.P.V. Duyne. “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**, Vol. 113 (16), pp.4581–4586.
- [219] C. Farcau, S. Astilean. “Mapping the SERS Efficiency and Hot-Spots Localization on

- Gold Film over Nanospheres Substrates” *J. Phys. Chem. C.* **2010**, Vol. 114 (27), pp.11717–11722.
- [220] D. Qin, Y. Xia, G.M. Whitesides. “Soft lithography for micro- and nanoscale patterning” *Nat. Protoc.* **2010**, Vol. 5 (3), pp.491–502.
- [221] C. Hamon, S. Novikov, L. Scarabelli, L. Basabe-Desmonts, L. M. Liz-Marzán. “Hierarchical Self-Assembly of Gold Nanoparticles into Patterned Plasmonic Nanostructures” *ACS Nano.* **2014**, Vol. 8 (10), pp.10694–10703.
- [222] C. Hanske, M. Tebbe, C. Kuttner, V. Bieber, V. V. Tsukruk, M. Chanana, T. A. F. König, A. Fery. “Strongly Coupled Plasmonic Modes on Macroscopic Areas via Template-Assisted Colloidal Self-Assembly” *Nano Lett.* **2014**, Vol. 14 (12), pp.6863–6871.
- [223] K.Y. Hong, J.W. Menezes, A.G. Brolo. “Template-Stripping Fabricated Plasmonic Nanogratings for Chemical Sensing” *Plasmonics.* **2018**, Vol. 13 pp.231–237.
- [224] K.Y. Hong, A.G. Brolo. “Polarization-dependent surface-enhanced Raman scattering (SERS) from microarrays” *Anal. Chim. Acta.* **2017**, Vol. 972 pp.73–80.
- [225] J. Yao, A.-P. Le, S.K. Gray, J.S. Moore, J.A. Rogers, R.G. Nuzzo. “Functional Nanostructured Plasmonic Materials” *Adv. Mater.* **2010**, Vol. 22 (10), pp.1102–1110.
- [226] L.J. Guo. “Nanoimprint Lithography: Methods and Material Requirements” *Adv. Mater.* **2007**, Vol. 19 (4), pp.495–513.
- [227] J. Wang, W. Zhou, J. Zhang, M. Yang, C. Ji, X. Shao, L. Shi. “High-fidelity replica molding for large-area PMMA 3D nanostructures with high performance surface-enhanced Raman scattering and hydrophobicity” *Microelectron. Eng.* **2014**, Vol. 115 pp.2–5.
- [228] C. Wu, P. Yao, C. Lin, C. Sung, C. Chen. “Fabrication of flexible metallic wire grid polarizer using thermal NIL and lift-off processes” *Microelectron. Eng.* **2012**, Vol. 98 pp.117–120.
- [229] S. Jang, J. Choi, M. Shin, J.H. Yeon, S.M. Kim, M. Choi. “Multiscale Hierarchical Patterning by Sacrificial Layer-Assisted Creep Lithography” *Adv. Mater. Interfaces.* **2019**, Vol. 6 (17), pp.1–8.
- [230] U. Plachetka, M. Bender, A. Fuchs, B. Vratzov, T. Glinsner, F. Lindner, H. Kurz. “Wafer scale patterning by soft UV-Nanoimprint Lithography” *Microelectron. Eng.* **2004**, Vol. 73–74 pp.167–171.
- [231] W. Wu, M. Hu, F.S. Ou, Z. Li, R.S. Williams. “Cones fabricated by 3D nanoimprint lithography for highly sensitive surface enhanced Raman spectroscopy” *Nanotechnology.* **2010**, Vol. 21 (25),.
- [232] T. Vo-Dinh. “Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures” *TrAC Trends Anal. Chem.* **1998**, Vol. 17 (8), pp.557–582.
- [233] C. Lee, C.S. Robertson, A.H. Nguyen, M. Kahraman, S. Wachsmann-Hogiu. “Thickness of a metallic film, in addition to its roughness, plays a significant role in SERS activity” *Sci. Rep.* **2015**, Vol. 5 (1), pp.11644.
- [234] D.L. Stokes, Z. Chi, T. Vo-Dinh. “Surface-Enhanced-Raman-Scattering-Inducing Nanoprobe for Spectrochemical Analysis” *Appl. Spectrosc.* **2004**, Vol. 58 (3), pp.292–298.

- [235] “SERS Substrates - Low cost and high performing SERS substrate, SERStrate, from Silmeco.” <https://www.silmeco.com/products/sers-substrate-serstrate/> (accessed May 29, 2020).
- [236] “Q-SERS.COM.” <http://www.q-sers.com/index.html> (accessed May 29, 2020).
- [237] “SERS Substrates | Surface Enhanced Raman Substrates | Ocean Insight.” <https://www.oceaninsight.com/products/sampling-accessories/raman/sers/sers/> (accessed May 30, 2020).
- [238] “SERS substrates | Hamamatsu Photonics.” https://www.hamamatsu.com/eu/en/product/optical-components/sers-substrate/index.html?nfxsid=CjwKCAjwiMj2BRBFEiwAYfTbCjtQXip9G2Hyg8XbNLKaGv17p6IwMaophXcUW1zAtJivOMsuYZ5ldhoCkFUQAvD_BwE&nfxsid=5ed27ec95d9cd1590853321&gclid=CjwKCAjwiMj2BRBFEiwAYfTbCjtQXip9G2Hyg8XbNLKaGv17p6IwMaophXcUW1zAtJivOMsuYZ5ldhoCkFUQAvD_BwE (accessed May 30, 2020).
- [239] R.A. Alvarez-Puebla, L.M. Liz-Marzán. “Traps and cages for universal SERS detection” *Chem. Soc. Rev.* **2012**, Vol. 41 (1), pp.43–51.
- [240] V.M. Szlag, R.S. Rodriguez, J. He, N. Hudson-Smith, H. Kang, N. Le, T.M. Reineke, C.L. Haynes. “Molecular Affinity Agents for Intrinsic Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Sensors” *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2018**, Vol. 10 (38), pp.31825–31844.
- [241] T.E. Rohr, T. Cotton, N. Fan, P.J. Tarcha. “Immunoassay employing surface-enhanced Raman spectroscopy” *Anal. Biochem.* **1989**, Vol. 182 (2), pp.388–398.
- [242] Z. Wang, S. Zong, L. Wu, D. Zhu, Y. Cui. “SERS-Activated Platforms for Immunoassay: Probes, Encoding Methods, and Applications” *Chem. Rev.* **2017**, Vol. 117 (12), pp.7910–7963.
- [243] J. Chen, J. Jiang, X. Gao, G. Liu, G. Shen, R. Yu. “A New Aptameric Biosensor for Cocaine Based on Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy” *Chem. – A Eur. J.* **2008**, Vol. 14 (27), pp.8374–8382.
- [244] Y. Wang, H. Wei, B. Li, W. Ren, S. Guo, S. Dong, E. Wang. “SERS opens a new way in aptasensor for protein recognition with high sensitivity and selectivity” *Chem. Commun.* **2007**, (48), pp.5220–5222.
- [245] L. Juhlin, T. Mikaelsson, A. Hakonen, M.S. Schmidt, T. Rindzevicius, A. Boisen, M. Käll, P.O. Andersson. “Selective surface-enhanced Raman scattering detection of Tabun, VX and Cyclosarin nerve agents using 4-pyridine amide oxime functionalized gold nanopillars” *Talanta.* **2020**, Vol. 211 pp.120721.
- [246] A. El Alami, F. Lagarde, U. Tamer, M. Baitoul, P. Daniel. “Enhanced Raman spectroscopy coupled to chemometrics for identification and quantification of acetylcholinesterase inhibitors” *Vib. Spectrosc.* **2016**, Vol. 87 pp.27–33.
- [247] S. E. J. Bell, N. M. S. Sirimuthu. “Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Probe of Competitive Binding by Anions to Citrate-Reduced Silver Colloids” *J. Phys. Chem. A.* **2005**, Vol. 109 (33), pp.7405–7410.
- [248] S. Kim, D.H. Kim, S.G. Park. “Highly sensitive and on-site NO₂ SERS sensors operated under ambient conditions” *Analyst.* **2018**, Vol. 143 (13), pp.3006–3010.
- [249] B. Ma, P. Li, L. Yang, J. Liu. “Based on time and spatial-resolved SERS mapping strategies for detection of pesticides” *Talanta.* **2015**, Vol. 141 pp.1–7.

- [250] A. Kim, S.J. Barcelo, Z. Li. "SERS-based pesticide detection by using nanofinger sensors" *Nanotechnology*. **2015**, Vol. 26 (015502),.
- [251] M. Sun, A. Zhao, D. Wang, J. Wang, P. Chen, H. Sun. "Cube-like Fe₃O₄@SiO₂@Au@Ag magnetic nanoparticles: A highly efficient SERS substrate for pesticide detection" *Nanotechnology*. **2018**, Vol. 29 (16),.
- [252] R.A. Alvarez-Puebla, E. Arceo, P.J.G. Goulet, J.J. Garrido, R.F. Aroca. "Role of nanoparticle surface charge in surface-enhanced raman scattering" *J. Phys. Chem. B*. **2005**, Vol. 109 (9), pp.3787–3792.
- [253] R. A. Alvarez-Puebla, R. F. Aroca. "Synthesis of Silver Nanoparticles with Controllable Surface Charge and Their Application to Surface-Enhanced Raman Scattering" *Anal. Chem.* **2009**, Vol. 81 (6), pp.2280–2285.
- [254] C.L. Jones, K.C. Bantz, C.L. Haynes. "Partition layer-modified substrates for reversible surface-enhanced Raman scattering detection of polycyclic aromatic hydrocarbons" *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, Vol. 394 (1), pp.303–311.
- [255] P. Leyton, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, M. Campos-Vallette, C. Saitz, R. E. Clavijo. "Selective Molecular Recognition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on Calix[4]arene-Functionalized Ag Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering" *J. Phys. Chem. B*. **2004**, Vol. 108 (45), pp.17484–17490.
- [256] Y. Xie, X. Wang, X. Han, X. Xue, W. Ji, Z. Qi, J. Liu, B. Zhao, Y. Ozaki. "Sensing of polycyclic aromatic hydrocarbons with cyclodextrin inclusion complexes on silver nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering" *Analyst*. **2010**, Vol. 135 (6), pp.1389–1394.
- [257] C.. Janeway, J.. Capra, P. Travers, M. Walport, M.. Shlomchik. The structure of a Typical Antibody Molecule, in: *Immunobiology*, 5th ed., Garland Science, New York, **2001**.
- [258] G.. Hermanson. Functional Targets, in: *Bioconjugate Tech.*, 2nd ed., Academic Press, Inc., New York, **2008**: pp. 783–823.
- [259] A. Balzerova, A. Fargasova, Z. Markova, V. Ranc, R. Zboril. "Magnetically-Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS) for Label-Free Determination of Human Immunoglobulin G (IgG) in Blood Using Fe₃O₄@Ag Nanocomposite" *Anal. Chem.* **2014**, Vol. 86 (22), pp.11107–11114.
- [260] T. Demeritte, B. Priya Viraka Nellore, R. Kanchanapally, S. Sekhar Sinha, A. Pramanik, S. Reddy Chavva, P. Chandra Ray. "Hybrid Graphene Oxide Based Plasmonic-Magnetic Multifunctional Nanoplatform for Selective Separation and Label-Free Identification of Alzheimer's Disease Biomarkers" *ACS Appl. Mater. & Interfaces*. **2015**, Vol. 7 (24), pp.13693–13700.
- [261] E.J. Cho, J.-W. Lee, A.D. Ellington. "Applications of Aptamers as Sensors" *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, Vol. 2 (1), pp.241–264.
- [262] K. Sun, Q. Huang, G. Meng, Y. Lu. "Highly Sensitive and Selective Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Label-free Detection of 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl Using DNA Aptamer-Modified Ag-Nanorod Arrays" *ACS Appl. Mater. & Interfaces*. **2016**, Vol. 8 (8), pp.5723–5728.
- [263] F. Barahona, C.L. Bardliving, A. Phifer, J.G. Bruno, C.A. Batt. "An Aptasensor Based on Polymer-Gold Nanoparticle Composite Microspheres for the Detection of Malathion Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy" *Ind. Biotechnol.* **2013**, Vol. 9 (1), pp.42–50.

- [264] E. Bagheri, L. Ansari, E. Sameiyan, K. Abnous, S.M. Taghdisi, M. Ramezani, M. Alibolandi. "Sensors design based on hybrid gold-silica nanostructures" *Biosens. Bioelectron.* **2020**, Vol. 153 (January), pp.112054.
- [265] K.J. Squire, K. Sivashanmugan, B. Zhang, J. Kraai, G. Rorrer, A.X. Wang. "Multiscale Photonic Crystal Enhanced Core-Shell Plasmonic Nanomaterial for Rapid Vapor-Phase Detection of Explosives" *ACS Appl. Nano Mater.* **2020**, Vol. 3 (2), pp.1656–1665.
- [266] A.B. Phatangare, S.D. Dhole, S.S. Dahiwalé, V.N. Bhoraskar. "Ultra-high sensitive substrates for surface enhanced Raman scattering, made of 3 nm gold nanoparticles embedded on SiO₂ nanospheres" *Appl. Surf. Sci.* **2018**, Vol. 441 pp.744–753.
- [267] H.K. Lee, Y.H. Lee, C.S.L. Koh, G.C. Phan-Quang, X. Han, C.L. Lay, H.Y.F. Sim, Y.-C. Kao, Q. An, X.Y. Ling. "Designing surface-enhanced Raman scattering (SERS) platforms beyond hotspot engineering: emerging opportunities in analyte manipulations and hybrid materials" *Chem. Soc. Rev.* **2019**, Vol. 48 (3), pp.731–756.
- [268] L.E. Kreno, N.G. Greeneltch, O.K. Farha, J.T. Hupp, R.P. Van Duyne. "SERS of molecules that do not adsorb on Ag surfaces: A metal-organic framework-based functionalization strategy" *Analyst.* **2014**, Vol. 139 (16), pp.4073–4080.
- [269] M.K. Oh, R. De, S.Y. Yim. "Highly sensitive VOC gas sensor employing deep cooling of SERS film" *J. Raman Spectrosc.* **2018**, Vol. 49 (5), pp.800–809.
- [270] S. Yang, X. Dai, B.B. Stogin, T.-S. Wong. "Ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering detection in common fluids" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, Vol. 113 (2), pp.268–273.
- [271] E.-C. Lin, J. Fang, S.-C. Park, F.W. Johnson, H.O. Jacobs. "Effective localized collection and identification of airborne species through electrodynamic precipitation and SERS-based detection" *Nat. Commun.* **2013**, Vol. 4 (1), pp.1636.
- [272] R. Kodiyath, S.T. Malak, Z.A. Combs, T. Koenig, M.A. Mahmoud, M.A. El-Sayed, V. V Tsukruk. "Assemblies of silver nanocubes for highly sensitive SERS chemical vapor detection" *J. Mater. Chem. A.* **2013**, Vol. 1 (8), pp.2777–2788.
- [273] X. Liu, S. Lebedkin, H. Besser, W. Pfleging, S. Prinz, M. Wissmann, P.M. Schwab, I. Nazarenko, M. Guttman, M.M. Kappes, et al. "Tailored surface-enhanced raman nanopillar arrays fabricated by laser-assisted replication for biomolecular detection using organic semiconductor lasers" *ACS Nano.* **2015**, Vol. 9 (1), pp.260–270.
- [274] H. Le-The, J.J.A. Lozeman, M. Lafuente, P. Muñoz, J.G. Bomer, H. Duy-Tong, E. Berenschot, A. van den Berg, N.R. Tas, M. Odijk, et al. "Wafer-scale fabrication of high-quality tunable gold nanogap arrays for surface-enhanced Raman scattering" *Nanoscale.* **2019**, Vol. 11 (25), pp.12152–12160.
- [275] A. Taflove, S.C. Hagness. *Computational electrodynamics: the finite-difference time-domain method*, Artech house, **2005**.
- [276] Z. Zeng, Y. Liu, J. Wei. "Recent advances in surface-enhanced raman spectroscopy (SERS): Finite-difference time-domain (FDTD) method for SERS and sensing applications" *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, Vol. 75 pp.162–173.
- [277] K. Yee. "Numerical solution of initial boundary value problems involving maxwell's equations in isotropic media" *IEEE Trans. Antennas Propag.* **1966**, Vol. 14 (3), pp.302–307.
- [278] "Sistema de identificación química Raman FirstDefender™ RM."

- <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/FIRSTDEFENDERRM#/FIRSTDEFENDERRM> (accessed June 6, 2020).
- [279] “ReporteR | Handheld Raman for Drugs and Explosives ID | Analytik.” <https://analytik.co.uk/product/handheld-raman-spectroscopy-reporter/> (accessed June 6, 2020).
- [280] “NanoRam® Handheld Raman Spectrometer for Material ID.” <https://bwtek.com/products/nanoram/> (accessed June 6, 2020).
- [281] “About Serstech Chemical Intelligence Company | Serstech.” <https://serstech.com/company/> (accessed June 6, 2020).
- [282] “Espectrómetro Raman portátil | BRAVO | Bruker.” <https://www.bruker.com/es/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/raman/bravo.html> (accessed June 6, 2020).
- [283] M.L. Bungabong, P. Bin Ong, K.-L. Yang. “Using copper perchlorate doped liquid crystals for the detection of organophosphonate vapor” *Sensors Actuators B Chem.* **2010**, Vol. 148 (2), pp.420–426.
- [284] L. Kong, J. Wang, T. Luo, F. Meng, X. Chen, M. Li, J. Liu. “Novel pyrenehexafluoroisopropanol derivative-decorated single-walled carbon nanotubes for detection of nerve agents by strong hydrogen-bonding interaction” *Analyst.* **2010**, Vol. 135 (2), pp.368–374.
- [285] O. Seok Kwon, S. Joo Park, J. Seop Lee, E. Park, T. Kim, H.-W. Park, S. Ah You, H. Yoon, J. Jang. “Multidimensional Conducting Polymer Nanotubes for Ultrasensitive Chemical Nerve Agent Sensing” *Nano Lett.* **2012**, Vol. 12 (6), pp.2797–2802.
- [286] D. Matatagui, M.J. Fernández, J. Fontecha, I. Sayago, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, J.P. Santos. “Characterization of an array of Love-wave gas sensors developed using electrospinning technique to deposit nanofibers as sensitive layers” *Talanta.* **2014**, Vol. 120 pp.408–412.
- [287] Y. Long, Y. Wang, X. Du, L. Cheng, P. Wu, Y. Jiang. “The Different Sensitive Behaviors of a Hydrogen-Bond Acidic Polymer-Coated SAW Sensor for Chemical Warfare Agents and Their Simulants” *Sensors* . **2015**, Vol. 15 (8),.
- [288] M. Pohanka, J. Binder, K. Kuca. “Sarin Assay using Acetylcholinesterases and Electrochemical Sensor Strip” *Def. Sci. J.* **2009**, Vol. 59 (3), pp.300–304.
- [289] “ChemProX | Environics Oy.” https://www.environics.fi/product/chemprox/?gclid=Cj0KCQjwIN32BRCCARIsADZ-J4sDyexeVPYP2cAh-b9nMnOBNW_bwukXWPs1s9sUFnXUPiHGZUW3s4aAvIgeALw_wcB (accessed June 3, 2020).
- [290] “Proengin Home - Proengin.” <https://www.proengin.com/> (accessed June 3, 2020).
- [291] “FIDO C3 | LAURUS Systems.” https://www.laurussystems.com/products/fido-c3/?_cf_chlaptcha_tk__=17ac7fedd986e1063000972e7352fd6833d0a002-1591182765-0-ATsZMP0xfvJxNgwm_ibYzaR-NG6qPMcJVylpF9gNXW1_g12x1JDya_oRK0nxKX3KI73YavRn-TmS947AstUpCq93BqP07BV1WTLdTb1acBO64Y1BUZ8A7KW6GBE-cu0s7pyjvBWm4G0R4DAup3-NyOuSF21n8PJJbh3PAj9ehKBzdGN3L6osyr8JHkyAGNFyT42GXvfvMk91YGdTc5jG3U-oANs26ExAZpiP82dFxMBqAxS1XZPhBkSO56g6eSQOKtduP-

- JtuXXx_VNPW6fgnNbD-rBjHfqjUt1Cxi4TvvssY8c0xw0mCuYKsde5i_dC_LFgWibWtukZnu8BhFLwQ8ZMUoFxE9tZJ_PzNEM4j5eO0LWrlMZTldwAo4nHGpV0xTETgb8rXq7O1ct4Cprg4WA8Bte03ea_I2qPeOiGMWZfJQ3jIhmtTuKuE7cxXa88m5lFIrsDKZwLFXfqv00yQtj2T9qnMgpfhSB5idTDOWIRGuS0fdfXFH3BrWpwsYxqw (accessed June 3, 2020).
- [292] “Handheld Trace Detector | MobileTrace® - Rapiscan Systems.” <https://www.rapiscansystems.com/en/products/hardened-mobiletrace> (accessed June 3, 2020).
- [293] R. Zamora-Sequeira, R. Starbird-Pérez, O. Rojas-Carillo, S. Vargas-Villalobos. “What are the main sensor methods for quantifying pesticides in agricultural activities? A review” *Molecules*. **2019**, Vol. 24 (14), pp.1–26.
- [294] R.P. Carneiro, F.A.S. Oliveira, F.D. Madureira, G. Silva, W.R. de Souza, R.P. Lopes. “Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis” *Food Control*. **2013**, Vol. 33 (2), pp.413–423.
- [295] D. Sharma, A. Nagpal, Y.B. Pakade, J.K. Katnoria. “Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review” *Talanta*. **2010**, Vol. 82 (4), pp.1077–1089.
- [296] Z. Khan, N. Kamble, A. Bhongale, M. Girme, V. Bahadur Chauhan, K. Banerjee. “Analysis of pesticide residues in tuber crops using pressurised liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry” *Food Chem*. **2018**, Vol. 241 pp.250–257.
- [297] W. Zhang, D. Li, Y. Xu, Z. Jiang, Y. Chen, P. Wang. “Synthesis and Application of Novel Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Materials Based on Carbon Nanotubes for Determination of Carbofuran in Human Serum by High Performance Liquid Chromatography” *J. Agric. Food Chem*. **2019**, Vol. 67 (18), pp.5105–5112.
- [298] E. Okada, T. Coggan, T. Anumol, B. Clarke, G. Allinson. “A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples” *Anal. Bioanal. Chem*. **2019**, Vol. 411 (3), pp.715–724.
- [299] H. Uk Lee, H. Yong Shin, J. Young Lee, Y. Seok Song, C. Park, S. Wook Kim. “Quantitative Detection of Glyphosate by Simultaneous Analysis of UV Spectroscopy and Fluorescence Using DNA-Labeled Gold Nanoparticles” *J. Agric. Food Chem*. **2010**, Vol. 58 (23), pp.12096–12100.
- [300] M. Zakery, A.A. Ensafi, B. Rezaei. “A Novel Optosensor for Rapid Detection of Difenconazole Using Molecularly Imprinted Polymers” *IEEE Sens. J*. **2018**, Vol. 18 (23), pp.9466–9470.
- [301] J. Halánek, J. Příbyl, A. Makower, P. Skládal, F.W. Scheller. “Sensitive detection of organophosphates in river water by means of a piezoelectric biosensor” *Anal. Bioanal. Chem*. **2005**, Vol. 382 (8), pp.1904–1911.
- [302] S. Viswanathan, H. Radecka, J. Radecki. “Electrochemical biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA” *Biosens. Bioelectron*. **2009**, Vol. 24 (9), pp.2772–2777.
- [303] R.A. Alvarez-Puebla. “Effects of the Excitation Wavelength on the SERS Spectrum” *J. Phys. Chem. Lett*. **2012**, Vol. 3 (7), pp.857–866.
- [304] D. Zhang, Y. Xie, S.K. Deb, V.J. Davison, D. Ben-Amotz. “Isotope edited internal

- standard method for quantitative surface-enhanced raman spectroscopy” *Anal. Chem.* **2005**, Vol. 77 (11), pp.3563–3569.
- [305] B.O. Skadtchenko, R. Aroca. “Surface-enhanced Raman scattering of p-nitrothiophenol: Molecular vibrations of its silver salt and the surface complex formed on silver islands and colloids” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2001**,.
- [306] Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea. “Reglamento (CE) N° 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Re” *D. Of. La Unión Eur.* **2008**, (353, de 31 de diciembre), pp.1 a 1355. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:353:0001:1355:es:PDF>.
- [307] J.C.S. Costa, R.A. Ando, A.C. Sant’Ana, P. Corio. “Surface-enhanced Raman spectroscopy studies of organophosphorous model molecules and pesticides” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, Vol. 14 (45), pp.15645–15651.
- [308] S. Farquharson, F.E. Inscore, S. Christesen. “Detecting chemical agents and their hydrolysis products in water” *Top. Appl. Phys.* **2006**, Vol. 103 pp.447–461.
- [309] V. V Singh, A.K. Nigam, M. Boopathi, P. Pandey, B. Singh, R. Vijayaraghavan. “In situ electrochemical sensing of 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES) a CWA simulant using CuPc/RTIL composite gold electrode” *Sensors Actuators B. Chem.* **2012**, Vol. 161 (1), pp.1000–1009.
- [310] F. Fathi, F. Lagugné-Labarthe, D.B. Pedersen, H.B. Kraatz. “Studies of the interaction of two organophosphonates with nanostructured silver surfaces” *Analyst.* **2012**, Vol. 137 (19), pp.4448–4453.
- [311] S.D. Christesen. “Raman Cross Sections of Chemical Agents and Simulants.” *Appl. Spectrosc.* **1988**, Vol. 42 (2), pp.318–321.
- [312] M.W. Knight, Y. Wu, J.B. Lassiter, P. Nordlander, N.J. Halas. “Substrates matter: influence of an adjacent dielectric on an individual plasmonic nanoparticle” *Nano Lett.* **2009**, Vol. 9 (5), pp.2188–2192.
- [313] J.J. Mock, R.T. Hill, A. Degiron, S. Zauscher, A. Chilkoti, D.R. Smith. “Distance-Dependent Plasmon Resonant Coupling between a Gold Nanoparticle and Gold Film” *Nano Lett.* **2008**, Vol. 8 (8), pp.2245–2252.
- [314] N. Yamamoto, S. Ohtani, F.J. García de Abajo. “Gap and Mie Plasmons in Individual Silver Nanospheres near a Silver Surface” *Nano Lett.* **2011**, Vol. 11 pp.91–95.
- [315] F.M. Huang, D. Wilding, J.D. Speed, A.E. Russell, P.N. Bartlett, J.J. Baumberg. “Dressing Plasmons in Particle-in-Cavity Architectures” *Nano Lett.* **2011**, Vol. 11 pp.1221–1226.
- [316] C. Ciraci, R.T. Hill, J.J. Mock, Y. Urzhumov, S.A. Maier, J.B. Pendry, A. Chilkoti, D.R. Smith. “Probing the Ultimate Limits of Plasmonic Enhancement” *Science (80-.)*. **2012**, Vol. 337 pp.1072–1075.
- [317] F. Schertz, M. Schmelzeisen, R. Mohammadi, M. Kreiter, H.-J. Elmers, G. Schönhense. “Near Field of Strongly Coupled Plasmons: Uncovering Dark Modes” *Nano Lett.* **2012**, Vol. 12 pp.1885–1890.
- [318] T.J. Seok, A. Jamshidi, M. Kim, S. Dhuey, A. Lakhani, H. Choo, P.J. Schuck, S. Cabrini, A.M. Schwartzberg, E. Yablonovitch, et al. “Radiation Engineering of Optical Antennas for Maximum Field Enhancement” *Nano Lett.* **2011**, Vol. 11 pp.2606–2610.

- [319] H.R. Stuart, D.G. Hall. “Enhanced Dipole-Dipole Interaction between Elementary Radiators Near a Surface” *Phys. Rev. Lett.* **1998**, Vol. 80 (25), pp.5663–5666.
- [320] J.J. Mock, R.T. Hill, Y. Tsai, A. Chilkoti, D.R. Smith. “Probing Dynamically Tunable Localized Surface Plasmon Resonances of Film-Coupled Nanoparticles by Evanescent Wave Excitation” *Nano Lett.* **2012**, Vol. 12 pp.1757–1764.
- [321] A. Moreau, C. Ciraci, J.J. Mock, R.T. Hill, Q. Wang, B.J. Wiley, A. Chilkoti, D.R. Smith. “Controlled-reflectance surfaces with film-coupled colloidal nanoantennas” *Nature.* **2012**, Vol. 492 pp.86–90.
- [322] M.A. Mahmoud, M. Chamanzar, A. Adibi, M.A. El-sayed. “Effect of the Dielectric Constant of the Surrounding Medium and the Substrate on the Surface Plasmon Resonance Spectrum and Sensitivity Factors of Highly Symmetric Systems: Silver Nanocubes” *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, Vol. 134 pp.6434–6442.
- [323] S. Sil, N. Kuhar, S. Acharya, S. Umapathy. “Is chemically synthesized graphene ‘Really’ a unique substrate for SERS and Fluorescence quenching?” *Sci. Rep.* **2013**, Vol. 3 pp.1–6.
- [324] N. Taranenko, J.-P. Alarie, D.L. Stokes, T. Vo-Dinh. “Surface-Enhanced Raman Detection of Nerve Agent Simulant (DMMP and DIMP) Vapor on Electrochemically Prepared Silver Oxide Substrates” *J. Raman Spectrosc.* **1996**, Vol. 27 (5), pp.379–384.
- [325] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson. “Gaussian 09, Revision D. 01, 2013, Gaussian” *Inc., Wallingford CT.* **2013**,.
- [326] A.D. Becke. “Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange” *J. Chem. Phys.* **1993**, Vol. 98 (7), pp.5648–5652.
- [327] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch. “Ab Initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields” *J. Phys. Chem.* **1994**, Vol. 98 (45), pp.11623–11627.
- [328] H. Hou, P. Wang, J. Zhang, C. Li, Y. Jin. “Graphene Oxide-Supported Ag Nanoplates as LSPR Tunable and Reproducible Substrates for SERS Applications with Optimized Sensitivity” *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2015**, Vol. 7 (32), pp.18038–18045.
- [329] X. Jiang, Q. Zeng, A. Yu. “Thiol-frozen shape evolution of triangular silver nanoplates” *Langmuir.* **2007**, Vol. 23 (4), pp.2218–2223.
- [330] S.K. Ghosh, S. Nath, S. Kundu, K. Esumi, T. Pal. “Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold colloids” *J. Phys. Chem. B.* **2004**, Vol. 108 (37), pp.13963–13971.
- [331] F.J. Beck, E. Verhagen, S. Mookapati, A. Polman, K.R. Catchpole. “Resonant SPP modes supported by discrete metal nanoparticles on high-index substrates” *Opt. Express.* **2011**, Vol. 19 (S2), pp.A146.
- [332] J.B. Lassiter, J. Aizpurua, L.I. Hernandez, D.W. Brandl, I. Romero, S. Lal, J.H. Hafner, P. Nordlander, N.J. Halas. “Close Encounters between Two Nanoshells” *Nano Lett.* **2008**, Vol. 8 (4), pp.1212–1218.
- [333] K.C. Vernon, A.M. Funston, C. Novo, D.E. Go, P. Mulvaney, T.J. Davis. “Influence of Particle - Substrate Interaction on Localized Plasmon Resonances” *Nano Lett.* **2010**, Vol. 10 (6), pp.2080–2086.

- [334] J. Lerme, C. Bonnet, M. Broyer, E. Cottancin, D. Manchon, M. Pellarin. "Optical Properties of a Particle above a Dielectric Interface: Cross Sections, Benchmark Calculations, and Analysis of the Intrinsic Substrate Effects" *J. Phys. Chem. C* **2013**, Vol. 117 (12), pp.6383–6398.
- [335] M. Alba, N. Pazos-Perez, B. Vaz, P. Formentin, M. Tebbe, M.A. Correa-Duarte, P. Granero, J. Ferré-Borrull, R. Alvarez, J. Pallares, et al. "Macroscale plasmonic substrates for highly sensitive surface-enhanced raman scattering" *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, Vol. 52 (25), pp.6459–6463.
- [336] M. Lafuente, E.J.W. Berenschot, R.M. Tiggelaar, R. Mallada, N.R. Tas, M.P. Pina. "3D fractals as SERS active platforms: Preparation and evaluation for gas phase detection of G-nerve agents" *Micromachines*. **2018**, Vol. 9 (2),.
- [337] J.C.S. Costa, R.A. Ando, A.C. Sant'Ana, P. Corio. "Surface-enhanced Raman spectroscopy studies of organophosphorous model molecules and pesticides" *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, Vol. 14 (45), pp.15645–15651.
- [338] Q. Zhao, G. Liu, H. Zhang, F. Zhou, Y. Li, W. Cai. "SERS-based ultrasensitive detection of organophosphorus nerve agents via substrate's surface modification" *J. Hazard. Mater.* **2017**, Vol. 324 pp.194–202.
- [339] D.A. Stuart, K.B. Biggs, R.P. Van Duyne. "Surface-enhanced Raman spectroscopy of half-mustard agent" **2006**, pp.568–572.
- [340] E. Luque-Michel, A. Larrea, C. Lahuerta, V. Sebastian, E. Imbuluzqueta, M. Arruebo, M.J. Blanco-Prieto, J. Santamaría. "A simple approach to obtain hybrid Au-loaded polymeric nanoparticles with a tunable metal load" *Nanoscale*. **2016**, Vol. 8 (12), pp.6495–6506.
- [341] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig. "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra" *Anal. Chem.* **2007**, Vol. 79 (11), pp.4215–4221.
- [342] Y. Wang, Y. Wang, H. Wang, M. Cong, W. Xu, S. Xu. "Surface-enhanced Raman scattering on a hierarchical structural Ag nano-crown array in different detection ways" *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, Vol. 17 (2), pp.1173–1179.
- [343] C.H. Munro, W.E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P.C. White. "Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering" *Langmuir*. **1995**, Vol. 11 (10), pp.3712–3720.
- [344] J.W. Park, J.S. Shumaker-Parry. "Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles" *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, Vol. 136 (5), pp.1907–1921.
- [345] L. Bertilsson, I. Engquist, B. Liedberg. "Interaction of dimethyl methylphosphonate with alkanethiolate monolayers studied by temperature-programmed desorption and infrared spectroscopy" *J. Phys. Chem. B*. **1997**, Vol. 101 (31), pp.6021–6027.
- [346] M.S. Schmidt, J. Hübner, A. Boisen. "Large area fabrication of leaning silicon nanopillars for Surface Enhanced Raman Spectroscopy" *Adv. Mater.* **2012**, Vol. 24 (10), pp.11–18.
- [347] A. Troupis, A. Hiskia, E. Papaconstantinou. "Synthesis of Metal Nanoparticles by Using Polyoxometalates as Photocatalysts and Stabilizers" *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, Vol. 41 (11), pp.1911.
- [348] Y. Wang, I.A. Weinstock. "Polyoxometalate-decorated nanoparticles" *Chem. Soc. Rev.*

- 2012**, Vol. 41 (22), pp.7479–7496.
- [349] S.G. Mitchell, J.M. De La Fuente. “The synergistic behavior of polyoxometalates and metal nanoparticles: From synthetic approaches to functional nanohybrid materials” *J. Mater. Chem.* **2012**, Vol. 22 (35), pp.18091–18100.
- [350] U. Jameel, M. Zhu, X. Chen, Z. Tong. “Recent progress of synthesis and applications in polyoxometalate and nanogold hybrid materials” *J. Mater. Sci.* **2016**, Vol. 51 (5), pp.2181–2198.
- [351] R. Liu, S. Li, X. Yu, G. Zhang, Y. Ma, J. Yao, B. Keita, L. Nadjo. “Polyoxometalate-assisted galvanic replacement synthesis of silver hierarchical dendritic structures” *Cryst. Growth Des.* **2011**, Vol. 11 (8), pp.3424–3431.
- [352] A. Pearson, S. Bhosale, S.K. Bhargava, V. Bansal. “Combining the UV-switchability of Keggin ions with a galvanic replacement process to fabricate TiO₂-polyoxometalate-bimetal nanocomposites for improved surface enhanced raman scattering and solar light photocatalysis” *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2013**, Vol. 5 (15), pp.7007–7013.
- [353] Y.H. Lai, S.W. Chen, M. Hayashi, Y.J. Shiu, C.C. Huang, W.T. Chuang, C.J. Su, H.C. Jeng, J.W. Chang, Y.C. Lee, et al. “Mesostuctured arrays of nanometer-spaced gold nanoparticles for ultrahigh number density of SERS hot spots” *Adv. Funct. Mater.* **2014**, Vol. 24 (17), pp.2544–2552.
- [354] B. Baruah, T.A. Miller. “Polyoxovanadate fabricated gold nanoparticles: Application in SERS” *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, Vol. 487 pp.209–216.
- [355] A. Castedo, E. Mendoza, I. Angurell, J. Llorca. “Silicone microreactors for the photocatalytic generation of hydrogen” *Catal. Today.* **2016**, Vol. 273 pp.106–111.
- [356] J.M. Maestre, X. Lopez, C. Bo, J.M. Poblet, N. Casañ-Pastor. “Electronic and magnetic properties of α -Keggin anions: A DFT study of [XM₁₂O₄₀]ⁿ⁻, (M = W, Mo; X = Al^{III}, Si^{IV}, PV, Fe^{III}, Co^{II}, Co^{III}) and [SiM₁₁VO₄₀]^{m-} (M = Mo and W)” *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, Vol. 123 (16), pp.3749–3758.
- [357] E. Tebandeke, C. Coman, K. Guillois, G. Canning, E. Ataman, J. Knudsen, L.R. Wallenberg, H. Ssekaalo, J. Schnadt, O.F. Wendt. “Epoxidation of olefins with molecular oxygen as the oxidant using gold catalysts supported on polyoxometalates” *Green Chem.* **2014**, Vol. 16 (3), pp.1586–1593.
- [358] A. Kyndiah, A. Ablat, S. Guyot-Reeb, T. Schultz, F. Zu, N. Koch, P. Amsalem, S. Chiodini, T. Yilmaz Alic, Y. Topal, et al. “A Multifunctional Interlayer for Solution Processed High Performance Indium Oxide Transistors” *Sci. Rep.* **2018**, Vol. 8 (1), pp.10946.
- [359] G.C. Lica, K.P. Browne, Y.Y. Tong. “Interactions between Keggin-type lacunary polyoxometalates and ag nanoparticles: A surface-enhanced raman scattering spectroscopic investigation” *J. Clust. Sci.* **2006**, Vol. 17 (2), pp.349–359.
- [360] I.V. Kozhevnikov. “Advances in Catalysis by Heteropolyacids” *Russ. Chem. Rev.* **1960**, Vol. 188 (4749), pp.453.
- [361] A.J. Bridgeman. “Computational study of the vibrational spectra of α - and β -Keggin” *Chem. - A Eur. J.* **2004**, Vol. 10 (12), pp.2935–2941.
- [362] M. Xu, C. Liu, Y. Xu, W. Li, L. Wu. “Incorporation of metal nanoparticles into H₃PMo₁₂O₄₀ hybrid Langmuir-Blodgett film through in-situ reduction” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2009**, Vol. 333 (1–3), pp.46–52.

- [363] J.E. Moore, S.M. Morton, L. Jensen. "Importance of correctly describing charge-transfer excitations for understanding the chemical effect in SERS" *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, Vol. 3 (17), pp.2470–2475.
- [364] T.T. Zhu, Z.M. Zhang, W.L. Chen, Z.J. Liu, E.B. Wang. "Encapsulation of tungstophosphoric acid into harmless MIL-101(Fe) for effectively removing cationic dye from aqueous solution" *RSC Adv.* **2016**, Vol. 6 (85), pp.81622–81630.
- [365] S. Reinoso, P. Vitoria, L. San Felices, L. Lezama, J.M. Gutiérrez-Zorrilla. "Analysis of weak interactions in the crystal packing of inorganic metalorganic hybrids based on Keggin polyoxometalates and dinuclear copper(II)-acetate complexes" *Inorg. Chem.* **2006**, Vol. 45 (1), pp.108–118.
- [366] G.C. Phan-quang, N. Yang, H.K. Lee, H. Yi, F. Sim, C. Sher, L. Koh, Y. Kao, Z.C. Wong, E. Khay, et al. "Tracking Airborne Molecules from Afar: Three-Dimensional Metal-Organic-Framework - Surface-Enhanced Raman Scattering (MOF-SERS) Platform for Stand-Off and Real-Time Atmospheric Monitoring" *ACS Nano.* **2019**, Vol. 13 (10),.
- [367] J. Rouquerol, D. Avnir, C.W. Fairbridge, D.H. Everett, J.M. Haynes, N. Pernicone, J.D.F. Ramsay, K.S.W. Sing, K.K. Unger. "Recommendations for the characterization of porous solids" *Pure Appl. Chem.* **1994**, Vol. 66 (8), pp.1739–1758.
- [368] L.T. Gibson. "Mesosilica materials and organic pollutant adsorption: part A removal from air" *Chem. Soc. Rev.* **2014**, Vol. 43 (15), pp.5163–5172.
- [369] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck. "Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism" *Nature.* **1992**, Vol. 359 (6397), pp.710–712.
- [370] T.W. Kim, P.W. Chung, V.S.Y. Lin. "Facile synthesis of monodisperse spherical MCM-48 mesoporous silica nanoparticles with controlled particle size" *Chem. Mater.* **2010**, Vol. 22 (17), pp.5093–5104.
- [371] L. Gomez, M. Arruebo, V. Sebastian, L. Gutierrez, J. Santamaria. "Facile synthesis of SiO₂-Au nanoshells in a three-stage microfluidic system" *J. Mater. Chem.* **2012**, Vol. 22 (40), pp.21420–21425.
- [372] C. Wang, M. Li, Q. Li, K. Zhang, C. Wang, R. Xiao, S. Wang. "Polyethyleneimine-mediated seed growth approach for synthesis of silver-shell silica-core nanocomposites and their application as a versatile SERS platform" *RSC Adv.* **2017**, Vol. 7 (22), pp.13138–13148.
- [373] S.Y. Moon, G.W. Wagner, J.E. Mondloch, G.W. Peterson, J.B. Decoste, J.T. Hupp, O.K. Farha, P. Li, R. Dong, Y. Wu, et al. "Effective, Facile, and Selective Hydrolysis of the Chemical Warfare Agent VX Using Zr₆-Based Metal-Organic Frameworks" *Nat. Mater.* **2014**, Vol. 85 (22), pp.269–275.
- [374] P. Xu, S. Guo, H. Yu, X. Li. "Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) for detoxification of hazardous organophorous chemicals" *Small.* **2014**, Vol. 10 (12), pp.2404–2412.
- [375] Z.A. Allothman. "A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials" *Materials (Basel).* **2012**, Vol. 5 pp.2874–2902.
- [376] M. Agrawal, S.E. Boulfelfel, D.F. Sava Gallis, J.A. Greathouse, D.S. Sholl. "Determining Diffusion Coefficients of Chemical Warfare Agents in Metal-Organic Frameworks" *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, Vol. 10 (24), pp.7823–7830.
- [377] G. Lu, J. T. Hupp. "Metal–Organic Frameworks as Sensors: A ZIF-8 Based Fabry–Pérot

- Device as a Selective Sensor for Chemical Vapors and Gases” *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, Vol. 132 (23), pp.7832–7833.
- [378] J.L.C. Rowsell, O.M. Yaghi. “Metal–organic frameworks: a new class of porous materials” *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, Vol. 73 (1), pp.3–14.
- [379] K.S. Park, Z. Ni, A.P. Côté, J.Y. Choi, R. Huang, F.J. Uribe-Romo, H.K. Chae, M. O’Keeffe, O.M. Yaghi. “Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks” *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, Vol. 103 (27), pp.10186 LP – 10191.
- [380] A. Phan, C. J. Doonan, F. J. Uribe-Romo, C. B. Knobler, M. O’Keeffe, O. M. Yaghi. “Synthesis, Structure, and Carbon Dioxide Capture Properties of Zeolitic Imidazolate Frameworks” *Acc. Chem. Res.* **2009**, Vol. 43 (1), pp.58–67.
- [381] S. R. Venna, M. A. Carreon. “Highly Permeable Zeolite Imidazolate Framework-8 Membranes for CO₂/CH₄ Separation” *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, Vol. 132 (1), pp.76–78.
- [382] I. Matito-Martos, P. Z. Moghadam, A. Li, V. Colombo, J. A. R. Navarro, S. Calero, D. Fairen-Jimenez. “Discovery of an Optimal Porous Crystalline Material for the Capture of Chemical Warfare Agents” *Chem. Mater.* **2018**, Vol. 30 (14), pp.4571–4579.
- [383] J. Zhao, D.T. Lee, R.W. Yaga, M.G. Hall, H.F. Barton, I.R. Woodward, C.J. Oldham, H.J. Walls, G.W. Peterson, G.N. Parsons. “Ultra-Fast Degradation of Chemical Warfare Agents Using MOF–Nanofiber Kebabs” *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, Vol. 55 (42), pp.13224–13228.
- [384] J.E. Mondloch, M.J. Katz, W.C. Isley, P. Ghosh, P. Liao, W. Bury, G.W. Wagner, M.G. Hall, J.B. Decoste, G.W. Peterson, et al. “Destruction of chemical warfare agents using metal-organic frameworks” *Nat. Mater.* **2015**, Vol. 14 (5), pp.512–516.
- [385] S.A. Melnychuk, A.A. Neverov, R.S. Brown. “Catalytic Decomposition of Simulants for Chemical Warfare V Agents: Highly Efficient Catalysis of the Methanolysis of Phosphonothioate Esters” *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, Vol. 45 (11), pp.1767–1770.
- [386] M.J. Katz, S.-Y. Moon, J.E. Mondloch, M.H. Beyzavi, C.J. Stephenson, T. Hupp, O.K. Farha. “Exploiting parameter space in MOFs : a 20-fold enhancement of phosphate-ester hydrolysis with UiO-66--NH₂” *Chem. Sci.* **2015**, Vol. 6 pp.2286–2291.
- [387] Q. Li, S. Gong, H. Zhang, F. Huang, L. Zhang, S. Li. “Tailored necklace-like Ag@ZIF-8 core/shell heterostructure nanowires for high-performance plasmonic SERS detection” *Chem. Eng. J.* **2019**, Vol. 371 (January), pp.26–33.
- [388] W. Stöber, A. Fink, B. Ernst. “Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range” *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, Vol. 26 (1), pp.62–69.
- [389] H. Nigar, B. Garcia-Baños, F.L. Peñarada-Foix, J.M. Catalá-Civera, R. Mallada, J. Santamaría. “Amine-Functionalized Mesoporous Silica: A Material Capable of CO₂ Adsorption and Fast Regeneration by Microwave Heating” *Am. Inst. Chem. Eng.* **2015**, Vol. 62 (2), pp.547–555.
- [390] D.G. Duff, A. Baiker, P.P. Edwards. “A New Hydrosol of Gold Clusters. 1. Formation and Particle Size Variation” *Langmuir.* **1993**, Vol. 9 (9), pp.2301–2309.
- [391] F. Almazán, I. Pellejero, A. Morales, M.A. Urbiztondo, J. Sesé, M.P. Pina, J. Santamaría. “Zeolite based microconcentrators for volatile organic compounds sensing at trace-level: fabrication and performance” *J. Micromechanics Microengineering.* **2016**, Vol. 26 (8), pp.084010.

- [392] A.B. Butrow, J.H. Buchanan, D.E. Tevault. "Vapor Pressure of Organophosphorus Nerve Agent Simulant Compounds" *J. Chem. Eng. Data.* **2009**, Vol. 54 pp.1876–1883.
- [393] M. Lafuente, I. Pellejero, V. Sebastián, M.A. Urbiztondo, R. Mallada, M.P. Pina, J. Santamaría. "Highly sensitive SERS quantification of organophosphorous chemical warfare agents: A major step towards the real time sensing in the gas phase" *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, Vol. 267 pp.457–466.
- [394] V. Montes-García, B. Gómez-González, D. Martínez-Solís, J.M. Taboada, N. Jiménez-Otero, J. De Una-Álvarez, F. Obelleiro, L. García-Río, J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos. "Pillar[5]arene-Based Supramolecular Plasmonic Thin Films for Label-Free, Quantitative and Multiplex SERS Detection" *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2017**, Vol. 9 (31), pp.26372–26382.
- [395] P. Hu, J. Zhuang, L.Y. Chou, H.K. Lee, X.Y. Ling, Y.C. Chuang, C.K. Tsung. "Surfactant-directed atomic to mesoscale alignment: Metal nanocrystals encased individually in single-crystalline porous nanostructures" *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, Vol. 136 (30), pp.10561–10564.
- [396] S. Chib, E. Greenberg. "Understanding the Metropolis-Hastings Algorithm" *Am. Stat.* **1995**, Vol. 49 (4), pp.327–335.
- [397] A.K. Rappe, C.J. Casewit, K.S. Colwell, W.A. Goddard, W.M. Skiff. "UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations" *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, Vol. 25 pp.10024–10035.
- [398] S. Link, M.B. Mohamed, M.A. El-Sayed. "Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant" *J. Phys. Chem. B.* **2002**, Vol. 103 (16), pp.3073–3077.
- [399] L. Scarabelli, M. Grzelczak, L.M. Liz-Marzán. "Tuning gold nanorod synthesis through prereduction with salicylic acid" *Chem. Mater.* **2013**, Vol. 25 (21), pp.4232–4238.
- [400] J. Cookney, W. Ogieglo, P. Hrabanek, I. Vankelecom, V. Fila, N.E. Benes. "Dynamic response of ultrathin highly dense ZIF-8 nanofilms" *Chem. Commun.* **2014**, Vol. 50 (79), pp.11698–11700.
- [401] G. Zheng, S. de Marchi, V. López-Puente, K. Sentosun, L. Polavarapu, I. Pérez-Juste, E.H. Hill, S. Bals, L.M. Liz-Marzán, I. Pastoriza-Santos, et al. "Encapsulation of Single Plasmonic Nanoparticles within ZIF-8 and SERS Analysis of the MOF Flexibility" *Small.* **2016**, pp.3935–3943.
- [402] J. Rouquerol, P. Llewellyn, F. Rouquerol. Is the BET equation applicable to microporous adsorbents, in: *Charact. Porous Solids VII*, Stud. Surf. Sci. Catal., Elsevier, Amsterdam and Oxford, **2007**: pp. 49–56.
- [403] Y.-S. Bae, A. Özgür Yazaydın, R. Q. Snurr. "Evaluation of the BET Method for Determining Surface Areas of MOFs and Zeolites that Contain Ultra-Micropores" *Langmuir.* **2010**, Vol. 26 (8), pp.5475–5483.
- [404] X. Lu, V. Nguyen, X. Zeng, B.J. Elliot, D.L. Gin. "Selective rejection of a water-soluble nerve agent stimulant using a nanoporous lyotropic liquid crystal-butyl rubber vapor barrier material: Evidence for a molecular size-discrimination mechanism" *J. Memb. Sci.* **2008**, Vol. 318 (1–2), pp.397–404.
- [405] G. Kumari, K. Jayaramulu, T.K. Maji, C. Narayana. "Temperature induced structural transformations and gas adsorption in the zeolitic imidazolate framework ZIF-8: A Raman study" *J. Phys. Chem. A.* **2013**, Vol. 117 (43), pp.11006–11012.

- [406] Z. Aksu, T. A.I., Ö. Tunc. "A comparative adsorption/biosorption study of Acid Blue 161: Effect of temperature on equilibrium and kinetic parameters" *Chem. Eng. J.* **2008**, Vol. 124 (1), pp.23–39.
- [407] L. Zheng, Z. Dang, X. Yi, H. Zhang. "Equilibrium and kinetic studies of adsorption of Cd(II) from aqueous solution using modified corn stalk" *J. Hazard. Mater.* **2010**, Vol. 176 (1–3), pp.650–6.
- [408] V. Vadivelan, K.. Kumar. "Equilibrium, kinetics, mechanism, and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk" *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, Vol. 286 (1), pp.90–100.
- [409] O. US EPA. "Agent GB (Sarin) Results - AEGL Program."
- [410] A. Roy, A.K. Srivastava, B. Singh, T.H. Mahato, D. Shah, A.K. Halve. "Degradation of sulfur mustard and 2-chloroethyl ethyl sulfide on Cu-BTC metal organic framework" *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, Vol. 162 pp.207–212.
- [411] Y. Son, S. Gon, H. Sung. "Rapid adsorption and removal of sulfur mustard with zeolitic imidazolate frameworks ZIF-8 and ZIF-67" *Microporous Mesoporous Mater.* **2020**, Vol. 293 (August 2019), pp.109819.
- [412] H.F. Talbot. "LXXXVI. Facts relating to optical science. No IV" *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1836**, Vol. 9 (56), pp.401–407.
- [413] H.H. Solak, C. Dais, F. Clube. "Displacement Talbot lithography: a new method for high-resolution patterning of large areas" *Opt. Express.* **2011**, Vol. 19 (11), pp.10686.
- [414] P.-M. Coulon, B. Damilano, B. Alloing, P. Chausse, S. Walde, J. Enslin, R. Armstrong, S. Vézian, S. Hagedorn, T. Wernicke, et al. "Displacement Talbot lithography for nano-engineering of III-nitride materials" *Microsystems Nanoeng.* **2019**, Vol. 5 (52),.
- [415] H.H. Solak, C. Dais, F. Clube, L. Wang. "Phase shifting masks in Displacement Talbot Lithography for printing nano-grids and periodic motifs" *Microelectron. Eng.* **2015**, Vol. 143 pp.74–80.
- [416] M. Vangbo, Y. Bäcklund. "Precise mask alignment to the crystallographic orientation of silicon wafers using wet anisotropic etching" *J. Micromechanics Microengineering.* **1996**, Vol. 6 (2), pp.279–284.
- [417] H. Le-The, E. Berenschot, R.M. Tiggelaar, N.R. Tas, A. van den Berg, J.C.T. Eijkel. "Shrinkage Control of Photoresist for Large-Area Fabrication of Sub-30 nm Periodic Nanocolumns" *Adv. Mater. Technol.* **2017**, Vol. 2 (3),.
- [418] H. Le-The, E. Berenschot, R.M. Tiggelaar, N.R. Tas, A. van den Berg, J.C.T. Eijkel. "Large-scale fabrication of highly ordered sub-20 nm noble metal nanoparticles on silica substrates without metallic adhesion layers" *Microsystems Nanoeng.* **2018**, Vol. 4 (1), pp.1–10.
- [419] H. Le-The, R.M. Tiggelaar, E. Berenschot, A. Van Den Berg, N. Tas, J.C.T. Eijkel. "Postdeposition UV-Ozone Treatment: An Enabling Technique to Enhance the Direct Adhesion of Gold Thin Films to Oxidized Silicon" *ACS Nano.* **2019**, Vol. 13 pp.6782–6789.
- [420] J.G.E. Wilbers, J.W. Berenschot, R.M. Tiggelaar, T. Dogan, K. Sugimura, W.G. Van Der Wiel, J.G.E. Gardeniers, N.R. Tas. "3D-fabrication of tunable and high-density arrays of crystalline silicon nanostructures" *J. Micromechanics Microengineering.* **2018**, Vol. 28 (4),.

- [421] W.M. Haynes. CRC handbook of chemistry and physics., 95th Editi, **2014**.
- [422] T.G. Habteyes, S. Dhuey, E. Wood, D. Gargas, S. Cabrini, P.J. Schuck, A.P. Alivisatos, S.R. Leone. “Metallic adhesion layer induced plasmon damping and molecular linker as a nondamping alternative” *ACS Nano*. **2012**, Vol. 6 (6), pp.5702–5709.
- [423] D.M. Schaadt, B. Feng, E.T. Yu. “Enhanced semiconductor optical absorption via surface plasmon excitation in metal nanoparticles” *Appl. Phys. Lett.* **2005**, Vol. 86 pp.063106.
- [424] B. Niesen, B.P. Rand, P. Van Dorpe, D. Cheyons, E. Fron, M. Van Der Auweraer, P. Heremans. “Near-Field Interactions between Metal Nanoparticle Surface Plasmons and Molecular Excitons in Thin-Films . Part II : Emission” *J. Phys. Chem. C*. **2012**, Vol. 116 pp.24215–24223.
- [425] Z. Tang, W. Tress, O. Ingana. “Light trapping in thin film organic solar cells” *Mater. Today*. **2014**, Vol. 17 (8),.
- [426] S. Pillai, K.R. Catchpole, T. Trupke, M.A. Green. “Surface plasmon enhanced silicon solar cells” *J. Appl. Phys.* **2007**, Vol. 101 pp.093105.
- [427] H.A. Atwater, A. Polman. “Plasmonics for improved photovoltaic devices” *Nat. Mater.* **2010**, Vol. 9 (March 2010), pp.205–213.
- [428] X. Liu, S. Lebedkin, H. Besser, W. Pfleging, S. Prinz, M. Wissmann, P.M. Schwab, I. Nazarenko, M. Guttman, M.M. Kappes, et al. “Tailored surface-enhanced raman nanopillar arrays fabricated by laser-assisted replication for biomolecular detection using organic semiconductor lasers” *ACS Nano*. **2015**, Vol. 9 (1), pp.260–270.
- [429] K. Wu, T. Rindzevicius, M. Stenbæk Schmidt, K.B. Mogensen, A. Hakonen, A. Boisen. “Wafer-scale leaning silver nanopillars for molecular detection at ultra-low concentrations” *J. Phys. Chem. C*. **2015**, Vol. 119 (4), pp.2053–2062.
- [430] L. Chen, T. Zhai, X. Zhang, C. Unger, J. Koch, B.N. Chichkov, P.J. Klar. “Polarization-dependent SERS effects of laser-generated sub-100 nm antenna structures” *Nanotechnology*. **2014**, Vol. 25 (265302),.
- [431] Z. Li, H.T. Hattori, P. Parkinson, J. Tian, L. Fu, H.H. Tan, C. Jagadish. “A plasmonic staircase nano-antenna device with strong electric field enhancement for surface enhanced Raman scattering (SERS) applications” *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2012**, Vol. 45 (305102),.
- [432] B. Yan, A. Thubagere, W.R. Premasiri, L.D. Ziegler, L. Dal Negro, B.M. Reinhard. “Engineered Sers Substrates with Multiscale signal Enhancement: Nanoparticle Cluster Arrays” *ACS Nano*. **2009**, Vol. 3 (5), pp.1190–1202.
- [433] K.H. Hsu, J.H. Back, K.H. Fung, P.M. Ferreira, M. Shim, N.X. Fang. “SERS EM field enhancement study through fast Raman mapping of Sierpinski carpet arrays” *J. Raman Spectrosc.* **2010**, Vol. 41 (10), pp.1124–1130.
- [434] Y.S. Yamamoto, M. Ishikawa, Y. Ozaki, T. Itoh. “Fundamental studies on enhancement and blinking mechanism of surface-enhanced Raman scattering (SERS) and basic applications of SERS biological sensing” *Front. Phys.* **2014**, Vol. 9 (1), pp.31–46.
- [435] Y.S. Hu, J. Jeon, T.J. Seok, S. Lee, J.H. Hafner, R.A. Drezek, H. Choo. “Enhanced Raman scattering from nanoparticle-decorated nanocone substrates: A practical approach to harness in-plane excitation” *ACS Nano*. **2010**, Vol. 4 (10), pp.5721–5730.
- [436] Z. Zeng, Y. Liu, J. Wei. “Recent advances in surface-enhanced raman spectroscopy (SERS): Finite-difference time-domain (FDTD) method for SERS and sensing

- applications” *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, Vol. 75 pp.162–173.
- [437] E.J.W. Berenschot, H. V. Jansen, N.R. Tas. “Fabrication of 3D fractal structures using nanoscale anisotropic etching of single crystalline silicon” *J. Micromechanics Microengineering.* **2013**, Vol. 23 (5),.
- [438] M. Lafuente, E. Martínez, I. Pellejero, M. del Carmen Artal, M. del Pilar Pina. “Wettability control on microstructured polypropylene surfaces by means of O₂ plasma” *Plasma Process. Polym.* **2017**, Vol. 14 (8),.
- [439] S.G. Rodrigo. *Optical Properties of Nanostructured Metallic Systems*, Springer Science & Business Media., **2012**.
- [440] S.G. Rodrigo, F.J. García-Vidal, L. Martín-Moreno. “Influence of material properties on extraordinary optical transmission through hole arrays” *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **2008**, Vol. 77 (7), pp.1–8.
- [441] E. Moreno, F. Garcia-Vidal, S.G. Rodrigo, L. Martin-Moreno. Fundamentals of channel and wedge plasmon polaritons, in: *Plasmon. Nanoguides Circuits*, Pan Stanford Publishing, Singapore, **2009**: pp. 253–272.
- [442] K. Yaakobi, Y. Liebes-Peer, A. Kushmaro, H. Rapaport. “Designed amphiphilic β -sheet peptides as templates for paraoxon adsorption and detection” *Langmuir.* **2013**, Vol. 29 (23), pp.6840–6848.
- [443] L. Ma, H. Wu, Y. Huang, S. Zou, J. Li, Z. Zhang. “High-Performance Real-Time SERS Detection with Recyclable Ag Nanorods@HfO₂ Substrates” *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2016**, Vol. 8 (40), pp.27162–27168.
- [444] D. Hank Ellison. *Handbook of Chemical and biological warfare agents*, **2000**.
- [445] R.K. Lauridsen, T. Rindzevicius, S. Molin, H.K. Johansen, R.W. Berg, T.S. Alstrøm, K. Almdal, F. Larsen, M.S. Schmidt, A. Boisen. “Towards quantitative SERS detection of hydrogen cyanide at ppb level for human breath analysis” *Sens. Bio-Sensing Res.* **2015**, Vol. 5 pp.84–89.
- [446] X. Qiao, X. Chen, C. Huang, A. Li, X. Li, Z. Lu, T. Wang. “Detection of Exhaled Volatile Organic Compounds Improved by Hollow Nanocages of Layered Doublehydroxide on Ag Nanowires” *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, Vol. 131 (46), pp.16675–16679.
- [447] H. Bao, H. Zhang, H. Fu, L. Zhou, P. Zhang, Y. Li, W. Cai. “Ultrathin layer solid transformation-enabled-surface enhanced Raman spectroscopy for trace harmful small gaseous molecule detection” *Nanoscale Horizons.* **2020**, Vol. 5 (4), pp.739–746.
- [448] “Agent GB (Sarin) Results - AEGL Program | Acute Exposure Guideline Levels for Airborne Chemicals | US EPA.” <https://www.epa.gov/aegl/agent-gb-sarin-results-aegl-program> (accessed April 30, 2020).
- [449] “Sulfur Mustard Results - AEGL Program | Acute Exposure Guideline Levels for Airborne Chemicals | US EPA.” <https://www.epa.gov/aegl/sulfur-mustard-results-aegl-program> (accessed April 30, 2020).
- [450] K. Jia, J. Xie, X. He, D. Zhang, B. Hou, X. Li, X. Zhou, Y. Hong, X. Liu. “Polymeric micro-reactors mediated synthesis and assembly of Ag nanoparticles into cube-like superparticles for SERS application” *Chem. Eng. J.* **2020**, Vol. 395 (April), pp.125123.
- [451] D. Kim, J. Lee, S. Yoo, S. Choi, D. Park, S. Park. “Quantitative Surface-Enhanced Raman

- Spectroscopy Analysis through 3D Superlattice Arrays of Au Nanoframes with Attomolar Detection” *Anal. Chem.* **2019**, Vol. 92 (2), pp.1972–1977.
- [452] E. Segal, E. Haleva, A. Salomon. “Ultrasensitive Plasmonic Sensor for Detecting Sub-PPB Levels of Alachlor” *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, Vol. 2 (3), pp.1285–1293.
- [453] Y. Xu, F.Y.H. Kutsanedzie, M. Hassan, J. Zhu, W. Ahmad, H. Li, Q. Chen. “Mesoporous silica supported orderly-spaced gold nanoparticles SERS-based sensor for pesticides detection in food” *Food Chem.* **2020**, Vol. 315 (January),.
- [454] J. Parisi, Q. Dong, Y. Lei. “In situ microfluidic fabrication of SERS nanostructures for highly sensitive fingerprint microfluidic-SERS sensing” *RSC Adv.* **2015**, Vol. 5 pp.14081–14089.
- [455] Q. Zhou, G. Meng, P. Zheng, S. Cushing, N. Wu, Q. Huang. “A Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor Integrated with Battery-Controlled Fluidic Device for Capture and Detection of Trace Small Molecules” *Science (80-.).* **2015**, Vol. 5 pp.12865–12876.
- [456] N. Knighton, B. Bugbee. “A Mixture of Barium Sulfate and White Paint is a Low-Cost Substitute Reflectance Standard for Spectralon ®” *North.* **1981**, (Figure 1), pp.4–6. https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1010&context=cpl_techniquesinstruments.
- [457] V.R. Weidner, J.J. Hsia. “Reflection Properties of Pressed Polytetrafluoroethylene Powder.” *J. Opt. Soc. Am.* **1981**, Vol. 71 (7), pp.856–861.
- [458] Commission Internationale de l’Eclairage. A review of publications on properties and reflection values of material reflection standards | CIE 046-1979. <http://cie.co.at/publications/review-publications-properties-and-reflection-values-material-reflection-standards> (accessed January 21, 2020).
- [459] N. Ismail, C.C. Kores, D. Geskus, M. Pollnau. “Fabry-Pérot resonator: spectral line shapes, generic and related Airy distributions, linewidths, finesses, and performance at low or frequency-dependent reflectivity” *Opt. Express.* **2016**, Vol. 24 (15), pp.16366.
- [460] P. V Schwartz, S. Member. “Fabry - Perot Optical Intensity Modulator at 1.3 microns in Silicon” *IEEE Photonics Technol. Lett.* **1991**, Vol. 3 (3), pp.9–10.
- [461] A. Janshoff, K.P.S. Dancil, C. Steinem, D.P. Greiner, V.S.Y. Lin, C. Gurtner, K. Motesharei, M.J. Sailor, M. Reza Ghadiri. “Macroporous p-type silicon Fabry-Perot layers. Fabrication, characterization, and applications in biosensing” *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, Vol. 120 (46), pp.12108–12116.

**Listado de publicaciones
&
Comunicación a congresos**

Listado de Publicaciones

1. M. Lafuente, I. Pellejero, A. Clemente, M.A. Urbiztondo, R. Mallada, S. Reinoso, M.P. Pina, L.M. Gandía. “*In-situ synthesis of SERS active Au@POM nanostructures in a microfluidic device for real time detection of water pollutants*”. **ACS Applied Material & Interfaces**, 2020. DOI: 10.1021/acsami.0c06725. IF = 8,758.
2. A. Chauvin, M. Lafuente, J.Y. Mevellec, R. Mallada, B. Humbert, M.P. Pina, P-Y. Tessier, A. El Mel. “*Lamellar nanoporous gold thin films with tuneable porosity for ultrasensitive SERS detection in liquid and gas phase*”. **Nanoscale**, 2020, 12, 12602-12612. DOI: 10.1039/D0NR01721C. IF = 6,895.
3. I. Pellejero, F. Almazán, M. Lafuente, M.A. Urbiztondo, M. Drobek, M. Bechelany, A. Julbe, L. M. Gandía. “*Functionalization of 3D printed ABS filters with MOF for toxic gas removal*”. **J. of Industrial and Engineering Chemistry**, 2020. DOI: 10.1016/j.jiec.2020.05.013. IF = 5,278.
4. M. Lafuente, E. Berenschot, R.M. Tiggelaar, S.G. Rodrigo, R.M. Mallada, N.R. Tas, M.P. Pina. “*Attomolar detection of organophosphorous pesticide using silver mirror like micro-pyramid as active substrate*”. **Microchimica Acta**, 2020, 187 (4), 1-10. DOI: 10.1007/s00604-020-4216-9. IF = 6,232.
5. M. Lafuente[‡], S. Ruiz-Rincón[‡], R. Mallada, P. Cea, M.P. Pina. “*Towards the reproducible fabrication of homogeneous SERS substrates by Langmuir-Schaefer technique: A low cost and scalable approach for practical SERS based sensing applications*”. **Applied Surface Science**, 2020, 506, 144663 DOI: 10.1016/j.apsusc.2019.144663. IF = 6,182.
[‡]Han contribuido en igual medida en el artículo.
6. M. Lafuente, D. Sanz, M.A. Urbiztondo, J. Santamaria, M.P. Pina, R. Mallada. “*Gas phase detection of chemical warfare agents CWAs with portable Raman*”. **Journal of Hazardous Materials**, 2020, 384, 121279. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121279. IF = 9,038
7. M. Lafuente, F. Almazán, E. Bernad, M.A. Urbiztondo, J. Santamaria, R. Mallada, M.P. Pina. “*SERS detection of neurotoxic agents in gas phase using microfluidic chips containing gold-mesoporous silica as plasmonic-sorbent*”. 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems & Euroensors XXXIII (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXXIII). **IEEE**, 2019, 1313-1316. DOI: 10.1109/TRANSDUCERS.2019.8808289.

8. H. Le-The, J. J. A. Lozeman, M. Lafuente, P. Muñoz, J. G. Bommer, H. Duy-Tong, E. Berenschot, A. van den Berg, N. R. Tas, M. Odijk, J. C. T. Eijkel. “*Wafer-scale fabrication of high-quality tuneable gold nanogap arrays for surface-enhanced Raman scattering*”. **Nanoscale**, 2019, 11 (25), 12152-12160. DOI: 10.1039/C9NR02215E: IF = 6,895.

9. M. Lafuente, I. Pellejero, V. Sebastián, M.A. Urbiztondo, R. Mallada, M.P. Pina, J. Santamaría. “*Highly sensitive SERS quantification of organophosphorous chemical warfare agents: A major step towards the real time sensing in the gas phase*”. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 2018, 267, 457-466. DOI: 10.1016/j.snb.2018.04.058. IF = 7,100.

10. M. Lafuente, E. Berenschot, R.M. Tiggelaar, R.M. Mallada, N.R. Tas, M.P. Pina. “*3D Fractals as SERS active platforms: preparation and evaluation for gas phase detection of G-Nerve agents*”. **Micromachines**, 2018, 9 (2), 60. DOI: 10.3390/mi9020060. IF = 2,523.

11. M. Lafuente, E. Martínez, I. Pellejero, M.C. Artal, M.P. Pina. “*Wettability control on microstructured polypropylene surfaces by means of O₂ plasma*”. **Plasma Process and Polymers**, 2017, 14 (8), 1700019. DOI: 10.1002/ppap.201700019. IF = 3,065. Contraportada edición agosto 2017.

Comunicación a congresos

1. “*Desarrollo de sustratos SERS para la detección de trazas en fase gas: Aplicación a la identificación de agentes neurotóxicos*”. M. Lafuente*, D. Sanz, E. Bernad, F. Almazán, M.A. Urbiztondo, J. Santamaría, M.P. Pina, R. Mallada. **XXXVI Jornadas Nacionales de Ingeniería Química. Zaragoza**, septiembre 2019.

Contribución: Comunicación Oral.

2. “*SERS detection of pesticides using plasmonic silver pyramids*”. M. Lafuente*, E.J.W. Berenschot, R.M. Tiggelaar, S.G. Rodrigo, R. Mallada, N. R. Tas, M.P. Pina. **IX NyNA 2019: International congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology. Zaragoza**, julio 2019.

Contribución: Poster.

3. “*Novel strategies based on Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for gas phase detection of neurotoxic agents at sub-ppm level*”. M. Lafuente*, D. Sanz, M.A. Urbiztondo, R. Mallada, M.P. Pina. **IX Franco-Spanish Workshop IBERNAM-CMC2. Tarragona**, octubre 2018.

Contribución: Comunicación Oral.

4. “*Fabrication and characterization of 3D machined micro/nanostructures with SERS response*”. M. Lafuente*, P. Muñoz, E.J.W. Berenschot, R.M. Tiggelaar, A. Susarrey-Arce, J.G.E Gardeniers, R. Mallada, M.P. Pina, S.M García-Blanco, N.R. Tas. **V MESA+ Meeting. Enschede (Países Bajos)**, septiembre 2018.

Contribución: Poster. 2º Premio Mejor Poster.

5. “*SERS para la detección de agentes de guerra química*” M. Lafuente*, M.A. Urbiztondo, I. Pellejero, M.P. Pina, R. Mallada, J. Santamaría. **Congreso Nacional de i+d en Defensa y Seguridad. Toledo**, noviembre 2017.

Contribución: Comunicación Oral.

6. “*3D Fractals as SERS substrates for detection of neurotoxic agents in gas phase*”. M. Lafuente, E.J.W. Berenschot, R.M. Tiggelaar, R. Mallada*, M.P. Pina, J. Santamaría, N. R. Tas. **The 3rd Conference on MicroFluidic Handling Systems. Enschede (Países Bajos)**, octubre 2017.

Contribución: Comunicación Oral.

7. “Detección de agentes neurotóxicos en fase gas a niveles traza mediante SERS”. M. Lafuente*, I. Pellejero, V. Sebastián, M.A. Urbiztondo, R. Mallada, M.P. Pina, J. Santamaría. **XXXVI Reunión Bienal de la Sociedad Española de Química**. Sitges (Barcelona), junio 2017.

Contribución: Comunicación Oral.

8. “Sustratos SERS para la detección de agentes de guerra química en fase gas”. M. Lafuente*, I. Pellejero, V. Sebastián, R. Mallada, M.P. Pina, J. Santamaría. 7^a **Jornada de Jóvenes Investigadores (Química y Física) de Aragón**. Zaragoza, noviembre 2016.

Contribución: Presentación Flash.

9. “Gold nanoparticles for Gas Sarin Identification by using MEMS and SERS technologies”. M. Lafuente, F. Almazán, V. Sebastián, I. Pellejero, A. Lostao, R. Mallada, J. Santamaría, M.P. Pina*. EMRS: European Materials Research Society. Lille (Francia), mayo 2016.

Contribución: Comunicación Oral.

10. “Gold nanoparticles for Gas Sarin Identification by using MEMS and SERS technologies”. M. Lafuente*, F. Almazán, V. Sebastián, I. Pellejero, A. Lostao, R. Mallada, J. Santamaría, M.P. Pina. **IberNAM: Red Española de Micro y Nano Sistemas**. Zaragoza, diciembre 2015.

Contribución: Presentación flash y poster.

