



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS
POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS



Síntesis y caracterización de nanopartículas
bimetálicas Au-Cu para una aplicación en SERS en
soluciones de Imidazol a bajas concentraciones

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS APLICADAS

PRESENTA:

GUILLERMO ALAM MOCTEZUMA SALAZAR

DIRECTOR(ES) DE TESIS:

Dr. HIRAM JOAZET OJEDA GALVÁN

Dra. SELENE CONCEPCIÓN ACOSTA MORALES

TESIS DE MAESTRIA

NOMBRE DE LA TESIS

Síntesis y caracterización de nanopartículas bimetálicas Au-Cu para una aplicación en SERS en soluciones de Imidazol a bajas concentraciones

NOMBRE DEL ALUMNO

Guillermo Alam Moctezuma Salazar

COMITÉ QUE ACEPTA LA TESIS

Dr. Hiram Joazet Ojeda Galván
Director

Dra. Selene Concepción Acosta Morales
Co-Directora

Dr. Eleazar Samuel Kolosovas Machuca
Sinodal

Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras
Sinodal

Dr. Edgar Giovanni Villabona Leal
Sinodal Externo

Dra. Mildred Quintana Ruiz
Sinodal Externo

Septiembre - 2022

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo, Guillermo Alam Moctezuma Salazar, estudiante del Posgrado en Ciencias Aplicadas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, como autor/(a) de la tesis “Síntesis y caracterización de nanopartículas bimetálicas Au-Cu para una aplicación en SERS en soluciones de Imidazol a bajas concentraciones”, declaro que la tesis es una obra original, inédita, auténtica, personal, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales vigentes que protegen los derechos de autor y de propiedad intelectual e industrial. Las ideas, doctrinas, resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.

RESUMEN

Uno de los retos actuales en el estudio de la tecnología SERS es la fabricación de nuevos sustratos, con esto en mente, la aleación de metales plasmónicos ha tomado un foco importante como posibles sustratos con propiedades potencialmente novedosas, la aleación Au-Cu como nanomaterial ha adquirido importancia de estudio por el hecho de que forma una solución sólida para todo el rango de composición y que en función de su tamaño y forma sus propiedades pueden cambiar, como por ejemplo su rango de absorción electromagnética. En este trabajo, se sintetizaron nanopartículas bimetálicas AuCu variando sus relaciones molares, de forma que se obtuvieron diferentes propiedades morfológicas, plasmónicas y de potencial Z, se caracterizaron con un microscopio electrónico de transmisión, un equipo de espectroscopía UV-Vis y un equipo de potencial Z, y se determinó en base a estas propiedades la mejor candidata a sustrato SERS.

Por otro lado, la detección de la molécula imidazol en diversas muestras tales como, alimentos o agua residual es de gran importancia. Debido a la posibilidad de detectar imidazol a muy bajas concentraciones, la detección de esta molécula por medio de SERS es una excelente opción, sin embargo, el factor de realce SERS depende en gran manera del sustrato, por esta razón, se encontraron que las nanopartículas plasmónicas con relación molar Au:Cu 3:1 son las que tienen mejores propiedades como sustratos SERS en el realce de la molécula de imidazol. Las pruebas SERS se hicieron con equipo micro-Raman dando con un factor de realce en el orden de 10^6 .

ABSTRACT

One of the current challenges in the study of SERS technology is in the fabrication of new substrates, with this in mind, the alarm of plasmonic metals has taken an important focus as possible substrates with novel properties, the Au-Cu attraction as a nanomaterial has acquired importance of study due to the fact that it forms a solid solution throughout the entire composition range, depending on its size and shape its properties can change, such as its electromagnetic absorption range, that is, as plasmonic materials they are about potential candidates for SERS substrates. In this work, bimetallic AuCu nanoparticles were synthesized varying their molar ratios, so that different morphological, plasmonic and Z potential properties were needed, they were characterized with a transmission electron microscope, a UV-Vis spectroscopy equipment and a potential equipment. Z, and based on these properties the best candidate for SERS substrate will be reduced.

On the other hand, the detection of the imidazole molecule in various samples such as food or wastewater is of great importance. Due to the possibility of detecting imidazole at very low concentrations, the detection of this molecule by means of SERS is an excellent option, however, the SERS enhancement factor depends largely on the substrate, for this reason, it was found that the nanoparticles Plasmonic molecules with a molar ratio Au:Cu 3:1 are the ones with the best properties as SERS substrates in the enhancement of the imidazole molecule. The SERS tests were carried out with micro-Raman equipment, giving an enhancement factor in the order of 10^6 .

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico brindado en la beca asignada del 01/sep/2018 al 31/ago/20 al programa 000582 – Maestría en Ciencias Aplicadas y de conformidad con el Reglamento de Becas del Programa de Fomento, Formación y Consolidación de Capital Humano de Alto Nivel (reglamento CONACyT), solicitud de beca 2018-000068-02NACF-09952.

Agradezco a la **Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACyT)**, una institución de enorme calidad e importancia para nuestro país, y que me brindó todo el apoyo durante mi estancia de maestría.

Agradezco al **Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB)**, una excelente institución científica que aborda temas sanitarios de gran relevancia en esta época, por brindarme el espacio, los equipos y un inigualable ambiente de trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer con especial hincapié a mi director de tesis, el Dr. Hiram Joazet Ojeda Galván, por sus invaluable conocimientos y consejos, su enorme paciencia conmigo, su tiempo, por permitirme ser su primer estudiante de a titular, por su constante participación en mi proyecto buscando siempre la manera de encontrar solución a los problemas que se presentaron hasta la culminación de este trabajo.

También quiero agradecer enormemente a mi asesora, la Dra. Selene Concepción Acosta Morales, por su disposición, tiempo, correcciones, conocimiento y su apoyo constante hasta el último día.

A la Dra. Mildred Quintana Ruíz, por todo el apoyo otorgado desde que llegue a su laboratorio, por generar un excelente y enriquecedor ambiente de trabajo, por estar siempre pendiente de sus alumnos y por su rápida respuesta para proveer las herramientas necesarias para que culminen los proyectos en el laboratorio.

Agradezco al Dr. Edgar Guevara Codina por su valiosa aportación intelectual para encontrar el factor de realce del sustrato SERS del proyecto. Al Dr. Edgar Giovanni Villabona Leal por su contribución intelectual en el área de espectroscopía, por compartir sus conocimientos y consejos en el área química, y su disposición en este proyecto. A la Dra. Maria del Carmen Rodríguez Aranda por su contribución en el área de UV-Vis, al Dr. Ángel Gabriel Rodríguez Vázquez por facilitar su equipo Raman, al Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras por facilitar el uso de las instalaciones en su laboratorio y su equipo de potencial Z, a la Dra. Harumi Moreno García por facilitar su equipo UV-Vis, a la Dra. Aida Catalina Hernández Arteaga por su guía en el área de SERS, al Dr. Y Dra. Javier Alanis Pérez y Maritza Ivette Pérez Valverde por brindarme el reactivo que se convertiría en parte clave de mi tesis, y por facilitarme artículos y conocimiento relevantes. Y finalmente al Dr. Eleazar Samuel

Kolosovas Machuca por su interés en mi proyecto y sus constantes observaciones, pero sobre todo, por su invitación al posgrado, que dio inicio a toda esta etapa.

A mis compañeros de laboratorio, Gisel Jiménez, Victoria Moreno, Diego Zapata, José Luis Flores, Ángel Ibáñez, Eduardo Negrete y Paty, por su excelente compañía y consejos, y con especial agradecimiento a Diana Blas, por su contribución en la metodología experimental de este proyecto y de Lorena Gárate por su constante actividad dentro del laboratorio, consejos, guía y tiempo.

A mis padres Virginia y Guillermo por su desinteresado amor hacia mí, su gran apoyo moral, económico y por su fe en mi como hijo y como profesional.

A mi hermano Pedro, por su apoyo moral en los momentos más difíciles.

Y a mis amigos Fer, Larry, Gis, Brandon, Carol y Mariana, por ser una valiosa parte de mi vida durante este trayecto, a Elihu, Charly, Quique y Olga por su compañerismo y rivalidad como amigos y compañeros del posgrado.

Un agradecimiento a mis abuelitas Boli y Vicky por servirme de ejemplo, inspiración y soporte, a mi abuelo Guillermo por su presencia y consejo, a mi abuelo Álvaro que en ausencia aún sirve de inspiración, a la ayuda incondicional de mis tíos, especialmente mi tío Fer y Gisel, y al consuelo, cariño, y soporte de quienes ya no están en mi vida, pero en su momento significaron un gran apoyo.

Finalmente, un agradecimiento a mí, por no rendirme.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2: ESTADO DEL ARTE.....	5
2.1 ESPECTROSCOPIAS VIBRACIONALES	5
2.1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	5
2.3 SERS.....	8
2.3.1 SUSTRATOS Y ANALITOS SERS.....	9
2.3.2 FACTOR DE REALCE.....	11
2.4 MATERIALES PLASMÓNICOS	13
2.4.1 ORO	17
2.4.2 COBRE	18
2.4.3 ORO - COBRE	18
2.5 ANALITO SERS: IMIDAZOL (IMZ).....	19
CAPÍTULO 3: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	22
3.1 JUSTIFICACIÓN.....	22
3.2 OBJETIVO GENERAL	22
SINTETIZAR NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS DE Au-Cu VARIANDO LA RELACIÓN MOLAR DE LOS PRECURSORES METÁLICOS Y SU APLICACIÓN COMO SUSTRATOS SERS PARA REALIZAR LA SEÑAL RAMAN DE LA MOLÉCULA DE IMIDAZOL A MUY BAJAS CONCENTRACIONES.....	22
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. DETERMINAR EL FACTOR DE REALCE DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS COMO SUSTRATOS SERS POR MEDIO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN DE LA MOLÉCULA IMIDAZOL.	23
3.4 HIPÓTESIS	23
CAPÍTULO 4: DESARROLLO EXPERIMENTAL	24

4.1 METODOLOGÍA DE LA SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS AU-CU	25
4.1.1 PROTOCOLO DE SÍNTESIS.....	27
4.1.2 MATERIALES Y REACTIVOS	28
4.1.3 METODOLOGÍA DE SÍNTESIS	30
4.1.4 LAVADO DE NPS	34
4.1.5 METODOLOGÍA DE LAS SIGUIENTES SÍNTESIS	35
4.2 METODOLOGÍA DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AU-CU.	40
4.2.1 ESPECTROSCOPÍA UV-VIS-IR	40
4.2.2 POTENCIAL Z	42
4.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....	45
4.3 PRUEBA SERS	47
CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1 POTENCIAL Z.....	50
5.2 UV-VIS.....	52
5.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	55
5.3.1 NPS BIMETÁLICAS AU-CU RELACIÓN MOLAR 1:1	55
5.3.2 NPS BIMETÁLICAS AU-CU RELACIÓN MOLAR 2:1	59
5.3.3 NPS BIMETÁLICAS AU-CU RELACIÓN MOLAR 3:1	61
5.3.3 NPS BIMETÁLICAS AU-CU RELACIÓN MOLAR 5:1	63
5.5 SERS.....	64
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	67
6.1 CONCLUSIONES.....	67
6.2 PERSPECTIVAS	68
BIBLIOGRAFÍA	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las líneas de dispersión de Rayleigh, Stokes y anti-Stokes en un espectro Raman.	6
Figura 2. Espectro Raman con una sonda de BSA en un buffer de PBS, (en negro) sin sustrato SERS, (en rojo) con sustrato SERS.	12
Figura 3. Micrografías SEM de las siguientes NPs de Au: (a) nanoesferas; (b) nanotriángulos, y (c) nanoestrellas ⁴⁸	15
Figura 4. Comparación de espectros de rodamina 6G SERS de 5 μ M en suspensiones de nanoestrellas, nanotriángulos, nanoesferas de Au de la Figura 3 ⁴³	16
Figura 5. Espectros UV-Visible de nanopartículas de Au-Cu (1 : 1), Au-Cu (1 : 2) y Au-Cu (1 : 3) que muestran un cambio batocrómico con un aumento en la composición de Cu en nanopartículas de aleación de Au-Cu.	17
Figura 6. Modelo representativo de una molécula de Imidazol, obtenido a partir del software libre Jmol.	20
Figura 7. Tautómeros de la histamina que contienen IMZ. tele ($N\tau$ -H-histamina), a la izquierda, es más estable que el tautómero pros ($N\pi$ -H-histamina) a la derecha.	21
Figura 8. Los dos tipos de rutas para sintetizar nanopartículas.	26
Figura 9. Emulsión de HDA y agua desionizada generada a partir de un precalentamiento del baño ultrasónico.	28
Figura 10. Soluciones de $H AuCl_4 \cdot 3H_2O$ y $CuCl_2$ respectivamente a una molaridad de 1 M.	29
Figura 11. Suspensión al agregar 150 μ L de $CuCl_2$ [0.1 M].	31
Figura 12. Suspensión al mezclar 150 μ L $CuCl_2$ [0.1 M] y 150 μ L $H AuCl_4$ [0.1 M].	31
Figura 13. Cambió de coloración a un azul claro indicativo de la nucleación.	32
Figura 14. Coloración final de la suspensión coloidal que contiene nanopartículas bimetálicas de Au-Cu.	33
Figura 15. Los 4 pasos de la síntesis esquematizados.	34
Figura 16. Centrifugadora Sartorius usada en los lavados.	35
Figura 17. Representación gráfica de las 11 diferentes síntesis y la coloración propia de la mezcla de ambas sales metálicas antes de la nucleación.	38
Figura 18. Representación gráfica de las 11 diferentes síntesis y la coloración adquirida una vez formadas las NPs previo a los lavados.	38
Figura 19. Espectrofotómetro UV Vis IR.	41
Figura 20. Representación del modelo de la doble capa para visualizar una partícula cargada ⁸¹	43
Figura 21. Zeta Sizer Nanoseries de la marca Malvern Panalytic.	44
Figura 22. Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol JEM 2100.	46
Figura 23. MicroRaman HORIBA XploRA PLUS.	48
Figura 24. Representación gráfica de la disposición del sustrato SERS la cual es una fina capa de NPs Au-Cu relación molar 3:1 sobre un sustrato de aluminio (paso 1), del analito SERS	

el cual es IMZ que va desde 1M hasta 10^{-9} molar (paso 2), y una vez seco la mezcla sobre el sustrato de aluminio se hizo una medición Raman (paso 3).....	49
Figura 25 Espectro de absorción de 3 NPs. En azul las NPs de Cu, en rojo las de Au y en negro la aleación Au:Cu con relación molar 1:1.	53
Figura 26. Espectro de absorción de las 5 NPs con mayor porcentaje de Au. En negro las NPs Au:Cu con relación molar 1:1, en amarillo las de relación molar 2:1, en naranja las de relación molar 3:1, en verde las de relación molar 5:1 y en azul las 11:1.....	54
Figura 27. Micrografías TEM de nanopartículas de Au-Cu relación molar 1:1. (a) Micrografía a baja magnificación (b) Micrografía de una partícula individual representativa.	55
Figura 28. Micrografías TEM y HAADF-STEM respectivamente de partículas individuales Au-Cu relación molar 1:1, ambas sintetizadas por el mismo protocolo excepto por una diferencia en la preparación del agente de cobertura. (a) Nanoestrella sintetizada con el protocolo modificado de López et. al(b) Nanoestrella sintetizada por el protocolo reportado por López et. al	56
Figura 29. Análisis de las micrografías correspondientes a las nanopartículas bimetálicas relación molar Au-Cu 1:1. (a) Micrografía TEM de la zona interna de la partícula bimetálica. (b)Transformada de Fourier {FFT} de la zona roja, en este espacio recíproco cada punto espejo representa un plano cristalográfico. (c) Transformada Inversa de Fourier {IFT} acorde al cuadro rojo.	58
Figura 30. Micrografías TEM de nanopartículas de Au-Cu relación molar 2:1. (a) Micrografía a baja magnificación mostrando agrupaciones de partículas. (b) Micrografía a baja magnificación mostrando de manera más clara las morfologías presentes.	59
Figura 31 Micrografías TEM correspondientes a las nanopartículas bimetálicas relación molar Au-Cu 2:1. (a) Micrografía TEM a alta magnificación de 2 partículas individuales. (b) Zona interna de la partícula. (c) Punta de la partícula.	60
Figura 32. Análisis de las micrografías correspondientes a las nanopartículas bimetálicas relación molar Au-Cu 3:1. (a) Micrografía TEM de baja magnificación (b) Micrografía TEM de alta magnificación, de partículas individuales (c) Micrografía TEM de alta magnificación de partícula individual con una Transformada de Fourier {FFT} de la zona roja, en este espacio recíproco cada punto espejo representa un plano cristalográfico. (d) Transformada Inversa de Fourier {IFT} acorde al cuadro rojo.	61
Figura 33. Micrografías TEM correspondientes a las nanopartículas bimetálicas relación molar Au-Cu 5:1. (a) Micrografía TEM a baja magnificación de un conjunto de partículas. (b)Media magnificación. (c)Alta magnificación de una partícula individual.	63
Figura 34. (a) Deconvolución de los principales modos Raman de la molécula IMZ, apilados en orden de concentración del analito, siendo una gráfica de corrimiento Raman contra intensidad. (b) Boxplot de los factores de realce puntuales por cada modo Raman	65
Figura 35. Regresión lineal de las medias de los EF por cada concentración de analito.	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos que se emplearon en la síntesis de las NPs bimetálicas Au-Cu.....	29
Tabla 2. Las 11 diferentes síntesis de AuCu con su respectivo porcentaje molar de Au....	36
Tabla 3. Las 11 diferentes síntesis llevadas a cabo en las que se variaron las relaciones molares de los precursores metálicos.	37
Tabla 4. El potencial Z correspondiente a cada una de las 11 síntesis.....	50

LISTA DE ACRÓNIMOS

ACRÓNIMO	DESCRIPCIÓN	TRADUCCIÓN
FFT	Fast Fourier Transform	Transformada de Fourier
HAADF-STEM	High-Angle Annular Dark Field Scanning Transmission Electron microscope	Imagen Angular de Campo Oscuro en modo Barrido de un Microscopio Electrónico de Transmisión
HB	Hydrogen Bonds	Enlaces de Hidrógeno
HDA	Hexadecylamine	Hexadecilamina
IFT	Inverse Fourier Transform	Transformada de Fourier Inversa
IMZ	Imidazole	Imidazol
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance	Resonancia Plasmónica de Superficie Localizada
NIR	Near Infrared	Infrarojo Cercano
NPs	Nanoparticles	Nanopartículas
RRS	Resonance Raman Spectroscopy	Espectroscopía Raman por Resonancia
SAM	Self-Assembled Monolayer	Monocapa autoensamblada
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy	Espectroscopía Raman por Realce de Superficie
SPR	Surface Plasmon Resonance	Resonancia del Plasmón Superficial
TEM	Transmission Electron Microscopy	Microscopía Electrónica de Transmisión
UV-VIS	Ultraviolet Visible	Ultravioleta Visible

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el estudio de nanomateriales ha tenido un crecimiento exponencial. Los nanomateriales tienen diversos campos de aplicación en subramas de la física, química, ciencia de materiales y medicina¹.

Las interesantes propiedades de las nanopartículas (NPs) están en función de su morfología, tamaño, composición, ordenamiento atómico y su química superficial², estas propiedades las convierte en candidatos atractivos para diversas aplicaciones, por ejemplo, en el campo de la medicina se pueden utilizar en la administración de fármacos y en aplicaciones teranósticas contra el cáncer³.

Las nanopartículas metálicas (principalmente de oro) han atraído un gran interés como una plataforma novedosa para la nanobiotecnología y la biomedicina⁴ debido a su conveniente bioconjugación de superficie con sondas moleculares y sus notables propiedades ópticas relacionadas con la resonancia de plasmones localizados (SPR)⁵. Los ejemplos publicados recientemente incluyen aplicaciones de NPs a la genómica⁶, biosensores⁷, inmunoensayos⁸, química clínica⁹, detección y control de microorganismos¹⁰, fototermólisis de células cancerosas¹¹⁻¹³, entrega dirigida de fármacos u otras sustancias¹⁴, obtención de imágenes ópticas y seguimiento de células y tejidos biológicos mediante técnicas de dispersión de resonancia¹⁵, tomografía de coherencia óptica¹⁶, luminiscencia de dos fotones¹⁷ o fotoacústica¹⁸.

No obstante, las NPs metálicas plasmónicas proporcionan nuevas plataformas para dispositivos de seguridad, sensores biológicos y químicos, catálisis heterogénea, células solares, espectroscopias mejoradas con plasmones e incluso teranósticos¹⁹.

Por otra parte, las NPs de cobre han adquirido un especial foco de atención como NPs metálicas plasmónicas debido a sus interesantes propiedades que no poseen las NPs de

metales nobles. A diferencia de los metales nobles con densidad de portadores restringida, una vez que se fijan el tamaño, la morfología y el medio circundante, la respuesta de la resonancia del plasmón superficial localizada (LSPR) se bloquea y no se puede ajustar de manera flexible. En las NPs de Cu, especialmente las que son dopadas con vacantes (agujeros), al generar una pequeña variación en la densidad de los portadores se tiene un fuerte efecto en la posición espectral y la intensidad de la LSPR. Esto permite una sintonización de la LSPR controlable en un amplio rango espectral, ya sea durante la síntesis o el postratamiento, lo que hace que las NPs de Cu sean muy fascinantes en una variedad de campos de investigación²⁰.

Originalmente los materiales plasmónicos se restringieron a los metales nobles, principalmente de Au y Ag, y sus propiedades ópticas ya están muy bien estudiadas, así como también sus principales aplicaciones entre las que destacan la detección de moléculas específicas, fotodiagnósticos y terapia fototérmica selectiva²¹, sin embargo, recientemente se ha revelado que no solo los metales nobles poseen SPR sino también en semiconductores altamente dopados con una densidad apreciable de portadores libres, incluidos óxidos metálicos dopados/autodopados aliovalentes, calcogenuros metálicos, nitruros metálicos y muchos otros²². Por ejemplo, óxido de indio (ITO)²³, óxido de zinc dopado con aluminio (AZO)²⁴, óxido de titanio dopado con niobio (NTO)²⁵, óxido de molibdeno deficiente en oxígeno (MoO_{3-x})²⁶ y óxido de tungsteno (WO_{3-x})²⁷, también los nitruros de metales de transición exhiben características plasmónicas y poseen propiedades superiores en comparación con los metales nobles, como durabilidad a altas temperaturas, estabilidad química, resistencia a la corrosión, bajo costo y dureza mecánica²⁸. Es por ello que, la sinergia entre metales y las nuevas propiedades de la bimetalicidad que surja de esta tiene especial atención como materiales emergentes.

Dentro de las aleaciones bimetálicas, la importancia de la aleación de oro-cobre (Au-Cu) proviene de su capacidad para formar una solución sólida en todo el rango de composición a altas temperaturas mientras forma fases ordenadas como AuCu_3 ($L1_2$), AuCu ($L1_0$) y Au_3Cu ($L1_2$), a temperaturas más bajas, también es una excelente forma de disminuir los costos de producción²⁹. A nivel de nanoescala, estas fases cambian de temperatura y composición según el tamaño y la forma de la nanopartícula³⁰.

La aleación de oro y cobre (AuCu) tiene dos tipos de estructuras ordenadas, AuCu I que tiene una estructura cristalina tetragonal centrada en las caras y AuCu II una estructura ortorrómbica. AuCu tiene también una fase desordenada cúbica centrada en las caras a temperaturas superiores a 410°C y las fases ordenadas se forman por debajo de esta temperatura. Debajo de los 380°C se forma AuCu I y entre los 380 y 410°C se forma la fase AuCu II³¹.

La Espectroscopía Raman por Amplificación Superficial “SERS” por sus siglas en inglés (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) es una técnica que permite realzar y definir el espectro Raman de diversos analitos químicos que se encuentran en bajas concentraciones. SERS fue descubierta en 1974 por Fleischmann y colaboradores³² al ser adsorbida una molécula de piridina en un electrodo de plata rugosa y notar un aumento en la intensidad del espectro Raman del analito correspondiente, pero no fue hasta 1977 que el fenómeno fue correctamente interpretado³³. El analito SERS, debe cumplir con ciertos requisitos para que su señal en Raman pueda ser amplificada, estos detalles se abordarán con más detalle en el capítulo 2, un ejemplo es tener modos vibracionales activos en Raman. Asimismo, el sustrato que realza la señal del analito también debe cumplir ciertos parámetros tanto individuales como en conjunto con el analito para que el fenómeno de amplificación SERS se lleve a cabo.

SERS tiene una amplia gama de aplicaciones, que van desde seguridad alimenticia y el aumento en la calidad en detección Raman para analizar la presencia de químicos peligrosos y tóxicos en distintas muestras así como detección de especímenes microbiológicos.³⁴ Actualmente, empresas como Horiba, Sigma Aldrich, entre otras comercializan sustratos SERS muy específicos, los cuales son fabricados por litografía o por deposición de metales como el oro, plata o cobre a escala nanométrica sobre un sustrato.

En general, la investigación que involucra la amplificación por SERS se considera una subrama de la ciencia de los materiales plasmónicos, ya que tienen una gran relación con los sustratos SERS³⁵, por lo tanto, para adentrarse en este campo de investigación es necesario entender los materiales plasmónicos y la ciencia que hay detrás de ellos.

Hoy en día, la investigación de materiales plasmónicos está centrada en métodos de síntesis, el impacto en el realce debido a diferentes medios, pH, estabilidad coloidal, entre otros; y

también en la búsqueda de nuevos sustratos con nuevas propiedades plasmónicas. En esta dirección, las nanopartículas de aleaciones de metales nobles tienen propiedades plasmónicas muy interesantes debido a su composición, forma y tamaño y son materiales prometedores para ser usados como sustratos SERS para la amplificación de señales Raman de una gran variedad de analitos.

CAPÍTULO 2: ESTADO DEL ARTE

2.1 Espectroscopias vibracionales

Las espectroscopías vibracionales son técnicas de caracterización que miden las frecuencias de las vibraciones de los enlaces químicos entre átomos en sólidos³⁶. Entre estas técnicas se encuentran la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y la espectroscopia Raman que utilizan radiación infrarroja (IR). La espectroscopia de pérdida de energía de electrones de alta resolución, HEELS, utiliza el impacto de electrones. Por último, la Resonancia Magnética Nuclear, NMR, involucra transiciones entre diferentes estados de espín del núcleo atómico en lugar de estados de vibración de enlace, pero proporciona información similar sobre la disposición de enlaces alrededor un átomo³⁷.

2.1.2 Espectroscopia Raman

Las moléculas y los cristales vibran con frecuencias determinadas por la masa de sus átomos y la fuerza de sus enlaces. La espectroscopía Raman es una técnica de caracterización de carácter no destructivo que provee información acerca de la estructura y de las propiedades moleculares del analito a través del análisis de las vibraciones moleculares de este. Esta técnica es sensible al arreglo atómico y al enlace químico en una determinada sustancia, por esta razón, se considera como una técnica de análisis estructural. Se puede obtener información sobre defectos y desorden a partir de esta técnica, sin embargo, la información sobre la composición química no se obtiene directamente de la espectroscopia Raman³⁸.

La muestra se irradia con una luz monocromática, generalmente de un láser en el visible, infrarrojo cercano o ultravioleta cercano, una pequeña parte de la energía del haz de luz es almacenada por los enlaces químicos de la muestra, cuando ocurre la relajación, la energía almacenada es irradiada y se pueden observar diferentes geometrías de dispersión, la gran

mayoría de la energía es irradiada a la misma frecuencia que la de la luz incidente, lo que se conoce como dispersión de Raleigh. Sin embargo, una pequeña parte de la energía almacenada se transfiere a la muestra y excita sus modos de vibración, lo que hace que la haz de luz pierda energía; este fenómeno se denomina dispersión de Stokes. También puede ocurrir el proceso contrario, en la muestra pueden existir estados vibratorios que ya estén excitados por procesos térmicos, estos estados vibratorios pueden agregar su energía al haz de luz, por lo que haz de luz incrementa su energía, esto se conoce como dispersión anti-Stokes. Estas tres geometrías de dispersión se observan en el espectro Raman de las muestras (Figura de un espectro Raman mostrando los 3 tipos de dispersión). La dispersión de Rayleigh se observa como una línea central fuerte en el espectro, las líneas de dispersión de Stokes se observan a frecuencias más bajas que el haz incidente con intensidades más bajas que las líneas de Rayleigh, la separación de las líneas de Stokes y Rayleigh brinda información directa sobre las frecuencias vibratorias de las muestras. Las líneas anti-Stokes aparecen a frecuencias más altas que las líneas de Rayleigh y son una imagen especular de las líneas de Stokes. Para la espectroscopia Raman, solo las líneas de dispersión de Stokes se reportan en el espectro, debido a la baja intensidad de las líneas de dispersión anti-Stokes asociadas a su fuerte dependencia de la existencia de estados vibracionales térmicamente activos. La mayoría de los espectrómetros Raman reportan la diferencia entre las líneas de Stokes y las líneas de Rayleigh, para observar directamente las frecuencias vibratorias de la muestra, esta diferencia de frecuencias se denomina número de onda.

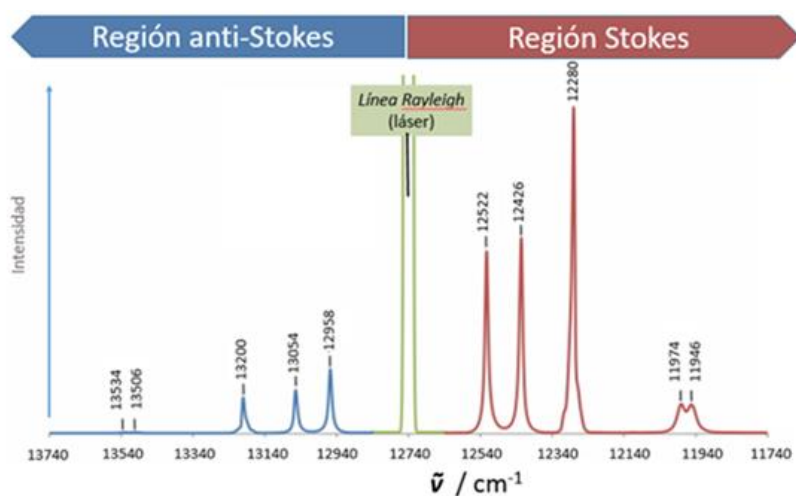


Figura 1. Representación esquemática de las líneas de dispersión de Rayleigh, Stokes y anti-Stokes en un espectro Raman.

Espectrómetro Raman

Dos tipos de espectrómetros Raman son los dispositivos más comercializados: espectrómetros dispersivos y espectrómetros Raman de transformada de Fourier. Sin embargo, ambos tipos tienen una instrumentación general: una fuente de luz traída hacia la muestra, un sistema de dispersión y un sistema de detección. La fuente de luz habitual para los espectrómetros Raman son los láseres. En general, se utilizan láseres con longitudes de onda en el área UV (< 200 nm) hasta el infrarrojo cercano (1064 nm), la longitud de onda seleccionada dependerá del tipo de muestra que se vaya a analizar. Respecto a los detectores, se utilizan diferentes tipos dependiendo del espectrómetro, para el caso de instrumentos dispersivos se utilizan detectores monocanal o multicanal, y para dispositivos de transformada de Fourier se utilizan semiconductores como el silicio y el germanio. Los detectores multicanal utilizados con mayor frecuencia son los detectores de dispositivos de carga acoplada (CCD). Estos detectores constan de una matriz bidimensional de elementos sensibles a la luz.

Disposición de las muestras

La espectroscopia Raman se puede registrar en un gran número de muestras con diferentes formas, tamaños de partículas y composiciones. Se puede adquirir el espectro Raman de líquidos, polvos y sólidos policristalinos, monocristales y películas gruesas y delgadas. Las muestras líquidas tienen que ser medidas en una celda especial con ventanas ópticas en ángulo recto. El tamaño de las muestras sólidas no suele ser un problema para la espectroscopia Raman (se pueden medir partículas con tamaños superiores a 100 nm). El espectro Raman de muestras en polvo se puede realizar mediante la creación de gránulos de la muestra, estos gránulos junto con especímenes a granel policristalinos como cerámica y rocas se miden a través del reflejo del láser desde la superficie de la muestra. Para el caso de las películas, el grosor mínimo al que se puede realizar la espectroscopia Raman varía según la transparencia de la muestra, pero generalmente está en el rango de unos pocos μm^{38} .

2.3 SERS

En pocas palabras, el efecto SERS consiste en amplificar las señales Raman (que provienen casi exclusivamente de moléculas) en varios órdenes de magnitud³⁹.

La amplificación de las señales en SERS proviene (principalmente) de la interacción electromagnética de la luz con los metales, lo que produce grandes amplificaciones del campo láser a través de excitaciones generalmente conocidas como resonancias plasmónicas. Para beneficiarse de estos, las moléculas normalmente deben adsorberse en la superficie del metal, o al menos estar muy cerca de ella (normalmente ≈ 10 nm como máximo). La denominación de dispersión Raman mejorada por superficie o SERS, resume especialmente bien estos tres pilares del efecto³⁵:

Superficie (S): SERS es una técnica de espectroscopia de superficie; las moléculas deben estar sobre (o cerca de) la superficie. Este es un punto importante para las aplicaciones de SERS. Uno debe asegurarse de que las moléculas a detectar puedan adherirse a (o al menos estar muy cerca) de la superficie del sustrato metálico. La transferencia de moléculas de un volumen a una superficie es un tema recurrente (y un problema) en las implementaciones prácticas de SERS.

Realce (E): La mejora de la señal la proporcionan las resonancias de plasmón en el sustrato metálico. El término "resonancias de plasmones" es, de hecho, una forma abreviada de una familia de efectos asociados con la interacción de la radiación electromagnética con los metales. Además, los metales aparecen en el efecto SERS (la mayoría de las veces) en forma de nanoestructuras metálicas, que abarcan una variedad de diferentes sustratos SERS, desde coloides metálicos en solución hasta sustratos fabricados por nanolitografía. o autoorganización.

Raman (R): La técnica consiste en medir las señales Raman de las moléculas (las sondas SERS o analitos). La espectroscopia Raman es el estudio de la dispersión inelástica de la luz y, cuando se aplica a las moléculas, proporciona información sobre su estructura química (en particular, su estructura vibratoria).

La **S** final en SERS puede significar Dispersión o Espectroscopia, dependiendo de si se prefiere enfatizar el efecto óptico (dispersión) o la técnica y sus aplicaciones (espectroscopia).

2.3.1 Sustratos y analitos SERS

Entre los muchos parámetros que se pueden variar en un experimento SERS, dos se destacan naturalmente: la especie molecular a detectar (la sonda o analito) y las estructuras metálicas sobre las que se adsorbe (el sustrato SERS). Estos dos aspectos son en gran medida independientes, aunque se requiere cierto grado de "compatibilidad": en última instancia, se debe garantizar que la sonda vaya al sustrato para beneficiarse de la amplificación de las señales Raman por resonancias de plasmones.

Sustratos SERS

Los buenos sustratos SERS son, en términos simples, aquellos que proporcionan la mayor mejora o amplificación. Las mejoras SERS surgen de una respuesta resonante del sustrato, por lo general dependen en gran medida de la longitud de onda, es decir, varían con la longitud de onda de excitación (y en menor grado con el desplazamiento Raman de los modos). Por lo tanto, un sustrato SERS dado exhibirá típicamente buenas mejoras en un rango de longitud de onda de excitación limitado. De hecho, la longitud de onda de excitación óptima podría verse como parte de la definición del sustrato SERS: un sustrato SERS excitado a la longitud de onda incorrecta ya no es un sustrato SERS (o solo uno realmente malo). La mayoría de los sustratos SERS están diseñados para operar con excitación visible/infrarroja cercana (~400–1000 nm), que es el rango típico de interés para los experimentos de dispersión Raman molecular.

Las mejoras no son las únicas características importantes de un sustrato SERS. Entre otros aspectos, mencionemos aquí la superficie. Al ser SERS una espectroscopia de superficie, el área de superficie del sustrato obviamente debería ser un parámetro importante (el área de superficie debe entenderse aquí como el área de superficie metálica dentro del volumen de observación de dispersión). Un área de superficie más grande aumenta el número potencial de moléculas que pueden producir SERS (por ejemplo, el número de moléculas en una monocapa). Esto no mejora la sensibilidad, ya que a bajas concentraciones (cobertura sub-

monocapa) estamos limitados principalmente por la ‘fuerza’ intrínseca de las señales SERS de la molécula. Hay, sin embargo, situaciones en las que las moléculas sólo se adhieren al sustrato en la primera capa (por contacto directo sobre el metal). La señal SERS máxima alcanzable está entonces limitada por el número máximo de moléculas en esta capa (el "problema de estacionamiento"). Si la molécula es un dispersor Raman débil y la señal SERS máxima alcanzable es demasiado baja, entonces la señal SERS no se puede medir. Las varias opciones posibles para evitar este problema son: (i) usar un sustrato con una mejora promedio mayor (esto aumenta la señal SERS promedio de las moléculas individuales), (ii) usar un sustrato con un área de superficie más grande (esto aumenta el número máximo de moléculas que producen la señal), (iii) para aumentar la potencia del láser, y (iv) para aumentar el volumen de dispersión (y por lo tanto el área de superficie sondeada). Esta última opción solo vale la pena si la densidad de potencia se mantiene constante, lo que generalmente requiere aumentar la potencia del láser como en (iii). Por lo tanto, las dos últimas opciones suelen estar limitadas por consideraciones instrumentales (potencia láser disponible)³⁵.

3 clases principales de sustratos SERS

1. Partículas metálicas (generalmente nanopartículas) en solución, como soluciones coloidales.
2. Estructuras metálicas 'planares', como conjuntos de nanopartículas metálicas soportadas sobre un sustrato plano (vidrio, silicio o metálico, por ejemplo).
3. Electrodo metálicos.

Analitos SERS

No todas las moléculas son buenos analitos SERS, aunque la técnica se puede utilizar con una notable variedad de analitos. Las dos características principales de una sonda SERS son:

Propiedades intrínsecas de Raman: la intensidad de la dispersión de Raman (caracterizada por la sección transversal de Raman⁴⁰) puede variar en muchos órdenes de magnitud según las moléculas en estudio y la longitud de onda del láser incidente. La dispersión Raman es, por ejemplo, particularmente intensa para moléculas con energías electrónicas cercanas a la energía del láser de excitación, por ejemplo, colorantes; esto se denomina dispersión Raman resonante (RRS). Las intensidades RRS pueden ser $\approx 10^6$ mayores que las intensidades Raman

normales (fuera de resonancia). Como regla general, los buenos dispersores Raman (como los tintes) son buenas sondas SERS. Esto es, en cierto modo, obvio: si la señal Raman es $\sim 10^6$ veces más fuerte antes de la amplificación, seguirá siendo (en general) $\sim 10^6$ veces más fuerte después de la amplificación (es decir, en condiciones SERS). Hay que tener en cuenta en este contexto que cuando SERS se mide con una sonda en condiciones RRS, a veces se denomina "SERRS" o "SE(R)RS", para dispersión Raman resonante mejorada en la superficie. Sin embargo, los principales mecanismos de mejora son los mismos (solo las moléculas a las que se aplican son diferentes). Finalmente, otras propiedades intrínsecas de Raman, como las simetrías del modo Raman, también influyen en sus propiedades SERS, pero en la mayoría de los casos esto es secundario.

Interacciones sonda/metal: la condición para que una molécula sea un "buen dispersor Raman" no es suficiente para que sea una buena sonda SERS. Además, debe ser capaz de adsorberse de manera eficiente en el sustrato SERS que se va a utilizar. Algunas moléculas tienen una fuerte afinidad química por tales superficies metálicas (por ejemplo, forman fuertes enlaces covalentes) y, por lo tanto, es más fácil trabajar con ellas. Los ejemplos de estos últimos incluyen moléculas con fracciones de tiol o triazol en su estructura⁴¹, que muestran una fuerte afinidad por el sustrato SERS. Otros mecanismos comunes de unión de la sonda son a través de interacciones electrostáticas; pero solo las sondas con la carga correcta (opuesta) se adsorberán en un sustrato cargado. La sonda y el sustrato ya no se pueden considerar como independientes. Este concepto se puede impulsar aún más en los sustratos SERS con funcionalización superficial: la superficie metálica se prepara químicamente para permitir (e idealmente facilitar) la unión de un solo tipo específico de analito. Una implementación típica (en aplicaciones biológicas) es la de una superficie metálica recubierta con antígenos que solo se unirían a anticuerpos específicos (sirviendo aquí como sondas SERS). Los problemas de las interacciones sonda/metal se encuentran entre los más importantes, y también los más difíciles, en las implementaciones de SERS.

2.3.2 Factor de Realce

La magnitud del factor de mejora (EF) (es decir, cuánto se amplifica la señal Raman con respecto a las condiciones normales, como en la Fig. 2⁴²) es uno de los aspectos más cruciales de SERS. Esto no solo es cierto para la mayoría de las aplicaciones, donde el interés en la

técnica radica en su sensibilidad mejorada, sino también para comprender los orígenes de SERS y los mecanismos físicos de esta mejora.

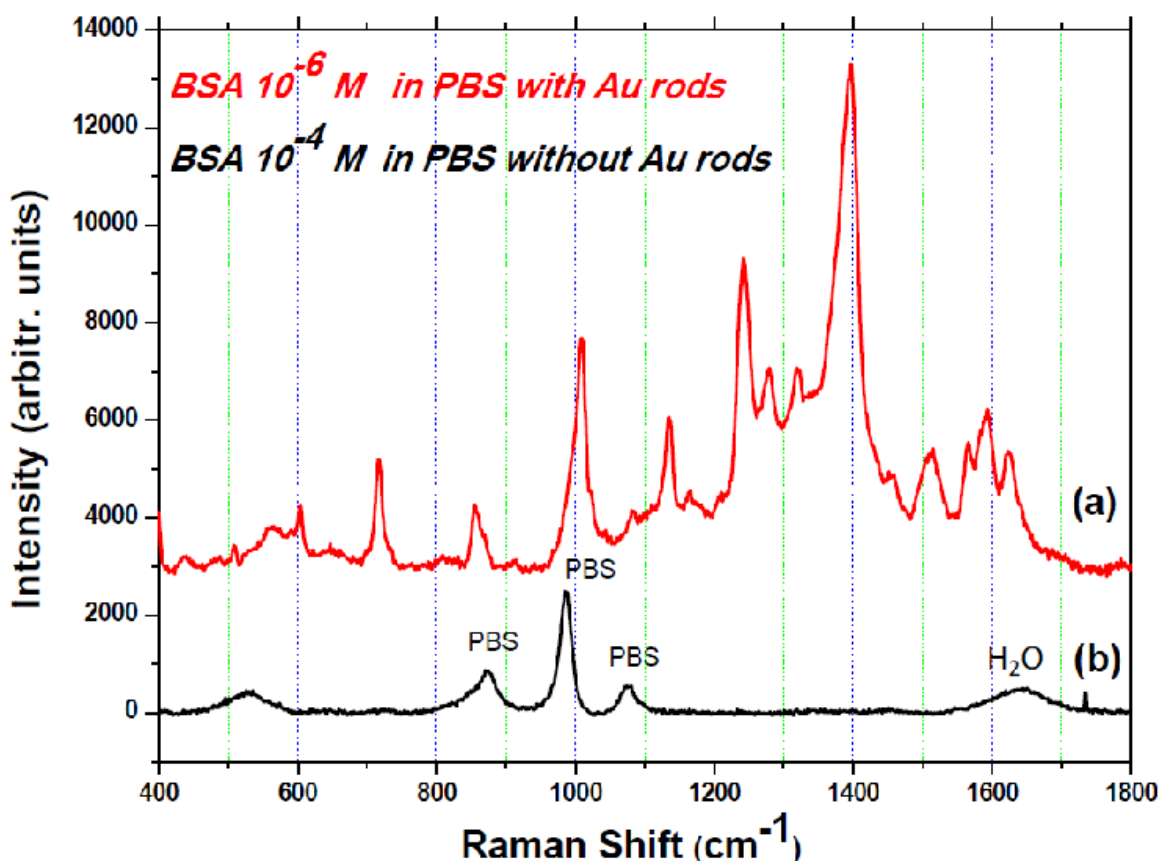


Figura 2. Espectro Raman con una sonda de BSA en un buffer de PBS, (en negro) sin sustrato SERS, (en rojo) con sustrato SERS.

Hay, en términos generales, dos características importantes principales para el factor de realce en un sustrato de SERS dado: (i) el SERS EF máximo y (ii) el SERS EF promedio.

SERS EF máximo

El SERS EF máximo generalmente ocurre en posiciones específicas en la superficie (los llamados puntos calientes) y solo aquellas moléculas adsorbidas allí pueden beneficiarse de él. El máximo SERS EF puede ser del orden de $\sim 10^6$ en una nanopartícula esférica, y ser tan alto como $\sim 10^{10}$ – 10^{11} ; por ejemplo, en el vértice de una punta metálica, o en un espacio nanométrico entre dos nanopartículas. Tales EF grandes suelen ser suficientes para detectar la señal SERS de una sola molécula, posiblemente la máxima sensibilidad en términos de

aplicaciones analíticas (como se mencionó antes). Sin embargo, actualmente no existe un control real sobre cómo crear tales puntos de acceso en ubicaciones predeterminadas; o, de manera equivalente, sobre cómo colocar una molécula dada en un punto caliente. Tenga en cuenta, sin embargo, que las mejoras del orden de $\sim 10^7$ – 10^8 ya pueden ser suficientes para detectar moléculas individuales en el caso de buenas sondas SERS.

SERS EF promedio

El SERS EF promedio es, como su nombre indica, el SERS EF promediado sobre todas las posiciones posibles en la superficie metálica. Por lo tanto, corresponde a la mejora en la señal esperada para las moléculas adsorbidas aleatoriamente en la superficie (en comparación con el mismo número de moléculas no adsorbidas). Los EF promedio de SERS pueden ser tan bajos como ~ 10 – 10^3 para condiciones no optimizadas. Los valores más típicos están en el rango de $\sim 10^5$ – 10^6 y deberían ser "fáciles" de lograr con sustratos "estándar". Son posibles valores tan grandes como $\sim 10^7$ – 10^8 y deben considerarse como muy buenos sustratos SERS⁴³.

2.4 Materiales plasmónicos

El término plasmón fue introducido por Pines en 1956 en la introducción de un artículo de revisión⁴⁴ sobre pérdidas colectivas de energía. En el trabajo de Pines encontramos la siguiente definición: “Las oscilaciones colectivas de los electrones de valencia se parecen mucho a las oscilaciones del plasma electrónico observadas en las descargas gaseosas. Introducimos el término 'plasmón' para describir el cuanto de excitación elemental asociado con este movimiento colectivo de alta frecuencia”.

Por lo tanto, un plasmón es una cuasipartícula cuántica que representa las excitaciones elementales, o modos, de las oscilaciones de densidad de carga en un plasma.

Una analogía útil para entender el significado de esta definición es recordar la definición formal de un fotón: es la partícula cuántica que representa las excitaciones elementales, o modos, de las oscilaciones del campo electromagnético libre. Por lo tanto, un plasmón es simplemente para la densidad de carga del plasma lo que los fotones son para el campo electromagnético. Por razones más históricas que científicas, el término plasmón tiende a

usarse en todas las situaciones, cuánticas o clásicas, en lugar de denominaciones equivalentes (clásicas) como oscilaciones de densidad de carga³⁵.

Por ejemplo, en el caso de una NP de Au esférica con un tamaño mucho más pequeño que la longitud de onda de la luz (aproximación cuasiestática), la distorsión de la nube de electrones en respuesta al campo eléctrico puede expresarse mediante la polarizabilidad del metal⁴⁵.

Y de acuerdo con el modelo de Drude para la respuesta óptica se puede llegar a la expresión cuasiestática de la sección eficaz de extinción (σ_{Ext}) en una NP esférica de Au:

$$\sigma_{\text{Ext}} = \frac{18\pi[\epsilon_m(\lambda)]^{3/2}}{\lambda} V_{\text{NP}} \frac{\text{Im}[\epsilon(\lambda)]}{[\text{Re}[\epsilon] + 2\epsilon_m(\lambda)]^2 + \text{Im}[\epsilon(\lambda)]^2} \quad (1)$$

Y de esta se obtienen las siguientes 3 conclusiones:

- I. Las propiedades plasmónicas de cualquier material están definidas por su $\epsilon(\omega)$
- II. σ_{Ext} escala con volumen de partículas
- III. σ_{Ext} es máximo cuando se minimiza el denominador, es decir, el LSP se excita a la frecuencia donde:

$$\text{Re}[\epsilon_{\text{NP}}(\omega)] \approx -\chi\epsilon_m(\omega). \quad (2)$$

La ecuación (2), también llamada condición de Fröhlich, define la condición SPR localizada. Claramente, la frecuencia de la SPR se puede sintonizar cambiando el $\epsilon_m(\omega)$ del medio circundante, pero también se ve fuertemente afectada por el tamaño, la forma y la composición de la NP⁴⁶.

Correlación entre la morfología del sustrato y el EF del analito.

Además del tamaño de la partícula, la magnitud del EF SERS también se ve afectado por la morfología de las NPs. Es en la síntesis de las nanoestructuras donde se ven afectados los parámetros de morfología; en las etapas de nucleación y crecimiento durante la reducción química determinan la distribución del tamaño de las partículas. Durante el proceso de nucleación, los átomos de metal se combinan y forman grupos y finalmente núcleos

cristalinos. Durante el paso de crecimiento, los núcleos de cristal, o "semillas", aumentan de tamaño para formar nanopartículas. La forma de las nanopartículas se puede controlar agregando surfactantes durante la síntesis⁴⁷. Estos tensoactivos provocan un cambio en la energía superficial y controlan la agregación de partículas. El surfactante estabiliza planos de cristal específicos en la nanoestructura en crecimiento, lo que permite un crecimiento controlado en ese plano. Dependiendo del surfactante y el material de partículas elegido, se puede crear una amplia variedad de formas de nanopartículas, como nanovarillas, nanocubos, nanoesferas, nanotriángulos, nanocables, nanoplacas y nanoestrellas. La Figura 2 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) obtenidas para nanoesferas, nanotriángulos y nanoestrellas de oro.

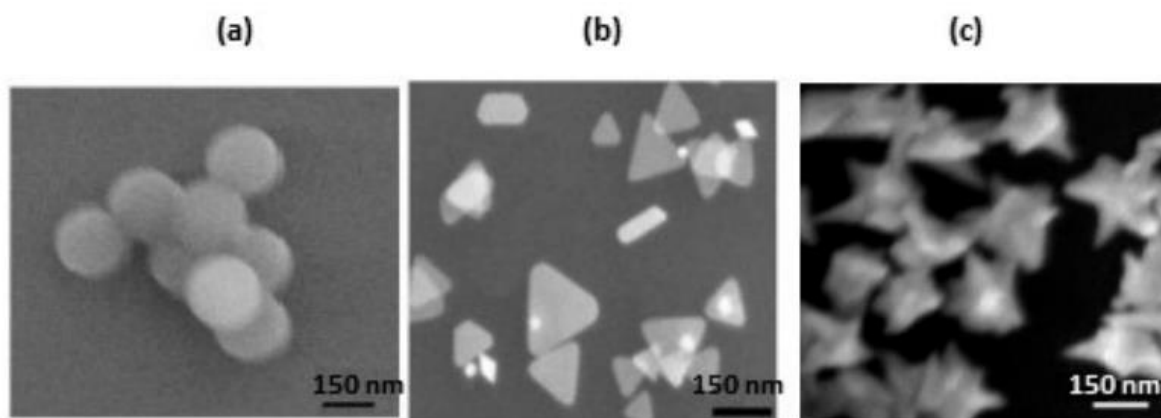


Figura 3. Micrografías SEM de las siguientes NPs de Au: (a) nanoesferas; (b) nanotriángulos, y (c) nanoestrellas⁴⁸.

Esto se muestra en los espectros SERS, Figura 3, obtenidos para rodamina 6G en suspensiones de nanoestrellas de oro, nanotriángulos y nanoesferas agregadas⁴⁸. El efecto SERS aumenta como nanoesferas < nanoesferas agregadas < nanotriángulos << nanoestrellas. La diferencia en la magnitud de la respuesta SERS para estas nanoestructuras se atribuye al número de "puntos calientes" intrínsecos por partícula, que aumenta a medida que las nanoesferas < nanotriángulos < nanoestrellas. Los puntos calientes son ubicaciones en las proximidades de las nanoestructuras plasmónicas donde el campo óptico local se mejora enormemente en comparación con su entorno⁴⁹. En consecuencia, cualquier molécula presente en un punto caliente SERS activo exhibirá una inmensa mejora en sus señales de dispersión Raman. Como se muestra en la Figura 3c, las nanoestrellas son nanopartículas en

forma de estrella con bordes y puntas afiladas. Las nanoestrellas muestran una sensibilidad muy alta a los cambios locales en el entorno dieléctrico, así como grandes mejoras del campo eléctrico alrededor de las nanopartículas⁴⁸.

La respuesta SERS fue insignificante para las nanoesferas no agregadas. Las imágenes SEM de las nanoestructuras se muestran en la Figura 1. Los espectros se obtuvieron utilizando una excitación láser de 785 nm⁴³.

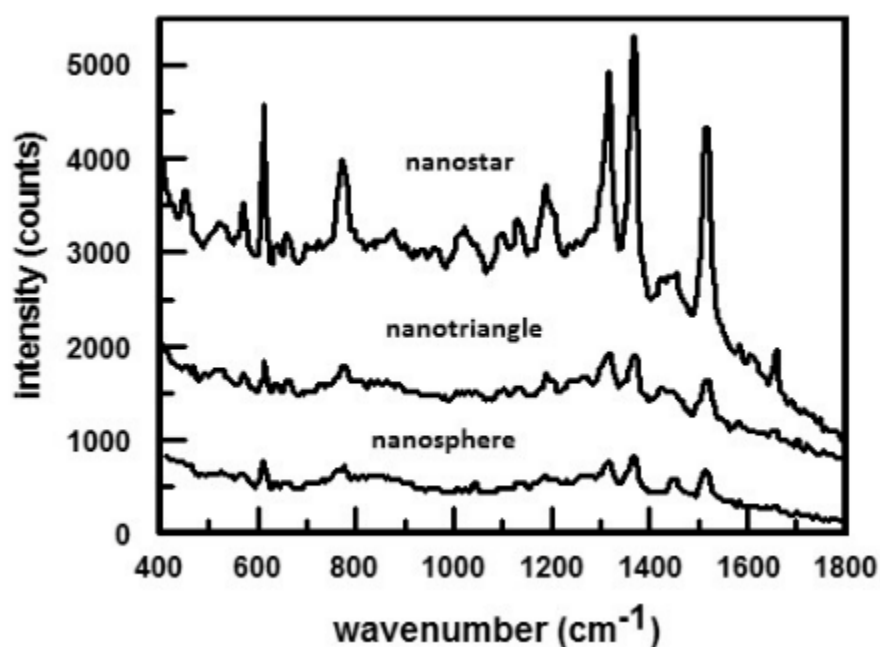


Figura 4. Comparación de espectros de rodamina 6G SERS de 5 μM en suspensiones de nanoestrellas, nanotriángulos, nanoesferas de Au de la Figura 3⁴³.

Correlación entre la composición del sustrato y el plasmón de resonancia superficial.

La composición de las NPs metálicas es un factor determinante la absorción pico del plasmón de resonancia superficial, como ejemplo se tienen los espectros UV-Visible de una aleación Au-Cu con varias composiciones de Au y Cu, como se pueden ver en la Figura 5. Dichos espectros muestran picos que tienen λ_{max} en la mitad de las nanopartículas puras de Au y Cu. La Figura 5 muestra un cambio batocrómico en la longitud de onda máxima con un

aumento en la composición de Cu en Au-Cu. También apoya las evidencias de confirmación de la formación de nanopartículas de aleación de Au-Cu⁵⁰.

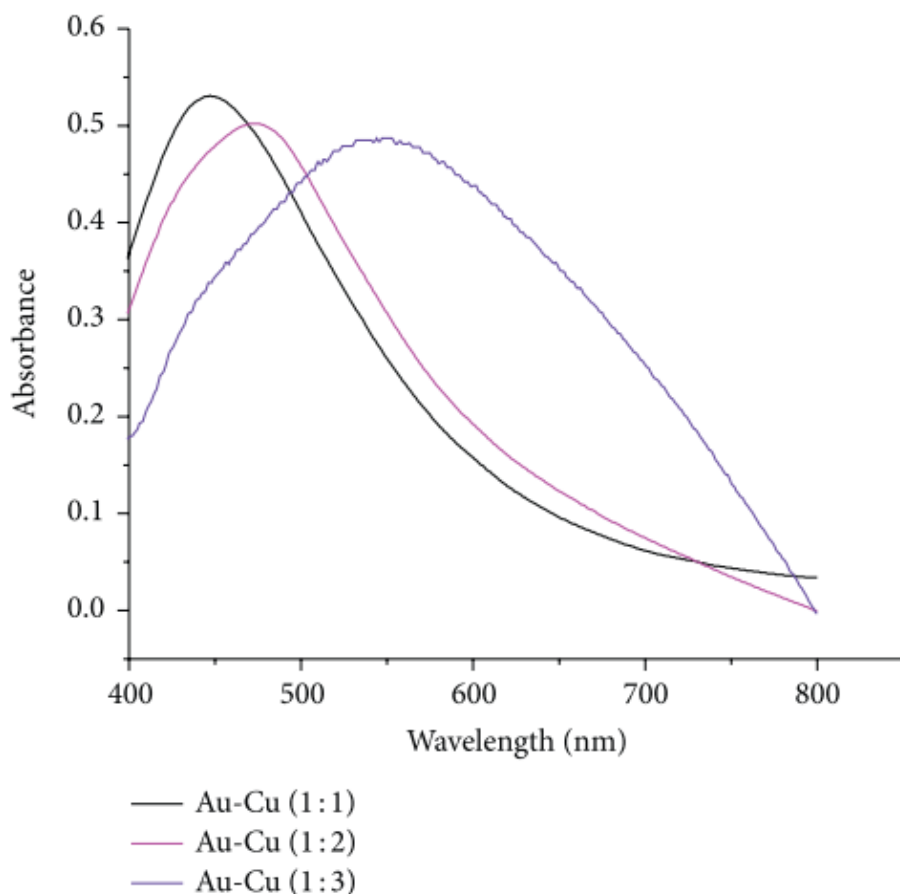


Figura 5. Espectros UV-Visible de nanopartículas de Au-Cu (1 : 1), Au-Cu (1 : 2) y Au-Cu (1 : 3) que muestran un cambio batocrómico con un aumento en la composición de Cu en nanopartículas de aleación de Au-Cu.

2.4.1 Oro

Desde el descubrimiento del efecto SERS en 1974 por Fleischmann⁵¹, las Nps de Au han sido uno de los sustratos SERS mas utilizados debido a sus propiedades favorables, a menudo se prefiere de la Ag por su mayor biocompatibilidad y estabilidad química, en particular contra la oxidación superficial y la disolución en ambientes líquidos a lo largo del tiempo³⁹. Otras características que los han convertido en el sistema modelo de elección para explorar una amplia gama de fenómenos, incluidos el autoensamblaje, el biomarcado, la catálisis, las

teorías de transferencia de electrones, la transferencia de fase, la fusión y los ensayos de ADN y el crecimiento de cristales⁵².

De la ecuación (1) para NPs de Au se tiene que el LSP está asociado a dos importantes efectos físicos:

- (i) La extinción óptica de Au NP tiene un máximo en la frecuencia SPR, que ocurre en longitudes de onda visibles-NIR y con una sección transversal de extinción (σ_{Ext}) que puede ser mucho mayor que su tamaño geométrico
- (ii) Las NP de Au se comportan como nanolentes, es decir, el campo electromagnético cerca de la superficie de la partícula (ya sea dentro o fuera de la NP) aumenta considerablemente y disminuye rápidamente con la distancia. Esto supera el límite de resolución de la óptica de campo lejano ordinaria, lo que permite la localización de la luz a escala nanométrica o subnanométrica.

2.4.2 Cobre

Las NPs de metales nobles, como Au y Ag, son los materiales plasmónicos más explotados sistemáticamente y exhiben principalmente sus LSPR en la región visible⁵³. Sin embargo, es muy deseable desarrollar tales nanoestructuras activas en SERS de alto rendimiento utilizando materiales de bajo costo. Un material muy prometedor para la fabricación de sustratos SERS es el Cu con un costo significativamente menor que la Ag y Au. Las NPs con una composición de Cu pueden proporcionar Factores de Realce SERS (EF) de hasta 10^5 - 10^7 ,⁵⁴. Además de las ventajas en términos de costo y disponibilidad, las NPs de Cu pueden proporcionar una mayor estabilidad en comparación con los sustratos SERS basados en Ag. En un estudio informado por Kudelski et al., la intensidad Raman de las moléculas adsorbidas en las NPs de Cu se mantuvieron constantes en el tiempo⁵⁵. También se ha reportado que las NPs de Cu proporcionan ventajas en las propiedades bactericidas en comparación con sus contrapartes Ag⁵⁶. Sin embargo, el número de estudios sobre el uso de sustratos SERS basados en Cu es limitado en comparación con los sustratos basados en Au y Ag.

2.4.3 Oro - Cobre

Los nanocristales de oro exhiben propiedades únicas y, a menudo, ajustables, como la resonancia de plasmones de superficie localizada (LSPR), la biocompatibilidad, la fácil

modificación de la superficie y el efecto catalítico hacia muchas reacciones de oxidación importantes, que promueven aplicaciones como la terapia fototérmica, el diagnóstico del cáncer, la obtención de imágenes, la administración de fármacos y control de contaminación⁵⁷. Por otra parte, cuando el cobre forma nanocristales este comparte muchas formas bien definidas descubiertas para el Au⁵⁸. Y de manera análoga al Au y otros metales nobles, los nanocristales de Cu pueden mostrar una fuerte absorción LSPR en el rango espectral del visible y el infrarrojo cercano (NIR)^{59,60}.

Sin embargo, la susceptibilidad del Cu tras la exposición al aire complica la síntesis y las aplicaciones de los nanocristales de Cu. Por lo tanto, la combinación de Au y Cu previsiblemente reducirá el alto costo de Au y mejorará la inestabilidad de Cu hacia la oxidación⁶¹.

La importancia de la aleación de oro-cobre (Au-Cu) proviene de su capacidad para formar una solución sólida en todo el rango de composición a altas temperaturas mientras forma fases ordenadas como AuCu₃ (L1₂), AuCu (L1₀) y Au₃Cu (L1₂), a temperaturas más bajas²⁹. A nivel de nanoescala, estas fases cambian de temperatura y composición según el tamaño y la forma de la nanopartícula⁶².

2.5 Analito SERS: Imidazol (IMZ)

El Imidazol (IMZ) es una molécula orgánica cíclica plana que consta de 3 átomos de carbono y 2 de nitrógeno en las posiciones 1 y 3 y tiene una fórmula molecular C₃H₄N₂ (Figura 6). Pertenece a una familia de compuestos aromáticos con un anillo nitrogenado con forma de pentágono que están caracterizados por tener fuertes enlaces intermoleculares de hidrógeno (N⋯H-N)⁶³. La molécula de 9 átomos IMZ posee 21 modos vibracionales internos.⁶⁴

El IMZ se encuentra en la estructura química de una gran variedad de moléculas biológicas importantes, como lo son las purinas que son bases nitrogenadas que se encuentran en el ADN de los seres vivos, el IMZ se encuentra también en algunos aminoácidos esenciales, el más preponderante de estos es el aminoácido "histidina", que tiene una cadena lateral de imidazol; la histidina y sus derivados poseen importantes propiedades farmacológicas⁶⁵.

La importancia que tiene esta molécula proviene del hecho de que su núcleo es un componente presente en muchos compuestos heterocíclicos bioactivos que son de gran

interés debido a sus diversas aplicaciones biológicas y clínicas. Además, el imidazol también se encuentra presente en distintos fármacos como en varios antiprotozoales, antifúngicos, fungicidas y medicamentos antihipertensivos, asimismo, algunos otros de los derivados del IMZ son usados en fármacos anticancerígenos, antivirales, antiVIH, antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antidiabéticas⁶⁶. El amplio uso de imidazol y sus derivados hace que la detección de IMZ a bajas concentraciones por medio de SERS tenga una gran relevancia en distintos campos tales como biología y medicina e inclusive en la detección de esta molécula en agua, para el tratamiento de aguas residuales.

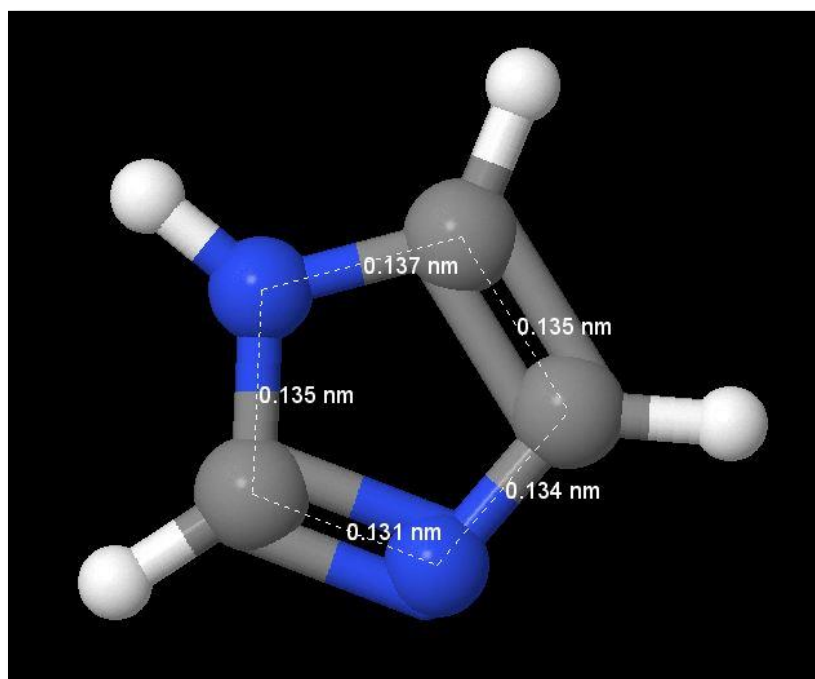


Figura 6. Modelo representativo de una molécula de Imidazol, obtenido a partir del software libre Jmol.

El anillo de imidazol juega un papel importante en la coordinación de biomoléculas con metales y la formación de sitios activos⁶⁷. En soluciones con pH fisiológico solo uno de los dos átomos de nitrógeno es protonado resultando en la existencia de dos formas tautoméricas (tautómero I, N1-H o N τ -H y tautómero II, N3-H o N π -H), los tautómeros son isómeros de compuestos orgánicos que se interconvierten fácilmente por una reacción química llamada tautomerización, esta reacción consiste en la migración formal de un átomo de hidrógeno o protón, acompañada por una modificación de enlaces simples y dobles adyacentes⁶⁸. El

equilibrio tautomérico es importante en la función enzimática del anillo de imidazol y la coordinación con los iones metálicos⁶⁹. La unión de anillos de imidazol ordenados en la interfaz electroquímica en forma de monocapa autoensamblada (SAM) ofrece una plataforma versátil para la construcción de complejos metálicos biomiméticos para estudios fundamentales y aplicados⁷⁰.

La espectroscopia Raman por realce superficial (SERS) puede proporcionar una rica información a nivel molecular sobre la unión, la conformación, las transformaciones redox y el orden de las moléculas adsorbidas en la cobertura de la submonocapa⁷¹. Un ejemplo de aplicación, en particular es en los diferentes tautómeros del anillo de imidazol, se pueden discriminar fácilmente mediante el análisis de bandas de marcadores Raman establecidas. Mientras que en solución acuosa prevalece la forma tautomérica N1-H (o N τ -H) del anillo de histamina imidazol, el equilibrio en la interfaz electroquímica puede ser diferente debido a las interacciones entre los anillos o cambios en el potencial del electrodo aplicado⁷².

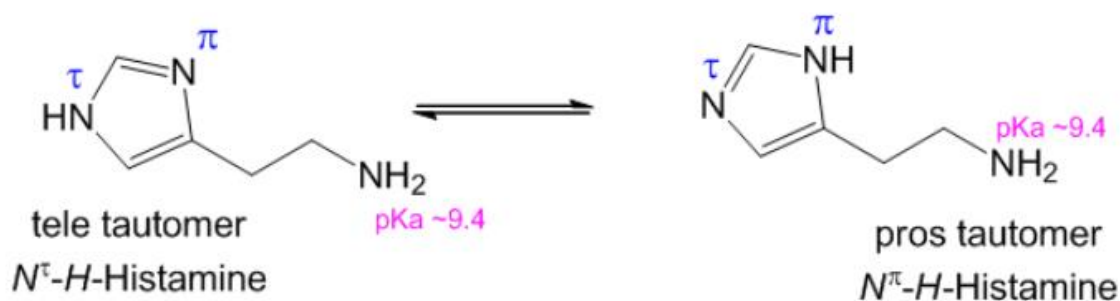


Figura 7. Tautómeros de la histamina que contienen IMZ. tele (N τ -H-histamina), a la izquierda, es más estable que el tautómero pros (N π -H-histamina) a la derecha.

En la Figura 7 se observan las dos formas tautoméricas del anillo de imidazol de la histamina, que existen en solución acuosa, identificadas por cuál de los dos átomos de nitrógeno está protonado.

CAPÍTULO 3: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

La detección de la molécula imidazol en diversas muestras tales como, alimentos o agua residual es de gran importancia. La detección de esta molécula por medio de SERS es una excelente opción para llevar a cabo este trabajo debido a la posibilidad de detectar imidazol a muy bajas concentraciones. Sin embargo, el factor de realce SERS depende en gran manera del sustrato. Por esta razón, en este trabajo diferentes nanopartículas bimetálicas de AuCu fueron sintetizadas para evaluarlas como sustratos SERS en el realce de la molécula imidazol. Se espera que, al variar el radio molar de los metales durante la síntesis, se obtengan nanopartículas con diferentes morfologías y propiedades plasmónicas que nos permitan determinar cuáles son aquellas propiedades que tienen mayor importancia para incrementar el factor de realce en SERS y así encontrar que nanopartículas son ideales para ser usadas como sustrato en el realce SERS de la molécula imidazol.

3.2 Objetivo General

Sintetizar nanopartículas bimetálicas de Au-Cu variando la relación molar de los precursores metálicos y su aplicación como sustratos SERS para realzar la señal Raman de la molécula de imidazol a muy bajas concentraciones.

3.3 Objetivos Específicos

1. Sintetizar 11 diferentes tipos de nanopartículas bimetálicas de Au-Cu con diferentes composiciones molares cada tipo.

2. Caracterizar los sistemas bimetálicos por medio de microelectroforesis doppler láser para medir el potencial Z, espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).
3. Escoger de entre las diferentes síntesis, el mejor candidato por sus propiedades como sustrato SERS para realzar la molécula de IMZ.
4. Determinar el factor de realce de las nanopartículas metálicas como sustratos SERS por medio de espectroscopia Raman de la molécula imidazol.

3.4 Hipótesis

Al optimizar la concentración de Au y Cu en la aleación Au-Cu mediante diferentes síntesis de nanopartículas bimetálicas se obtendrán nanopartículas con diferente morfología y por lo tanto diferentes propiedades de realce, en consecuencia, se obtendrán las nanopartículas bimetálicas con mejores características como sustrato SERS de acuerdo a esta síntesis y que presenten el mejor realce SERS de la molécula imidazol.

CAPÍTULO 4: DESARROLLO EXPERIMENTAL

La metodología de este trabajo consta de tres partes. La primera parte consiste en la síntesis utilizada para la preparación de las nanopartículas (NPs) bimetálicas de oro-cobre (Au-Cu). La segunda aborda las técnicas que se utilizaron para caracterizar las NPs bimetálicas de Au-Cu entre las que se encuentran la medición del potencial Z, la espectroscopía ultravioleta-visible (espectroscopía UV-Vis), la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Finalmente, la tercera parte describe la espectroscopía Raman y el procedimiento metodológico que se empleó para llevar a cabo la prueba de espectroscopía Raman de realce por superficie (SERS por sus siglas en inglés *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*), la cual requiere un analito a medir, un sustrato metálico que realza la señal y un equipo Raman donde se lleva a cabo la medición.

4.1 Metodología de la síntesis de las nanopartículas bimetálicas Au-Cu

Las NPs bimetálicas de Au-Cu fueron sintetizadas en base a un método previamente reportado por el grupo del Dr. Yacamán en el artículo de Lourdes Bazán et al¹¹, sin embargo, durante este trabajo realizamos algunas modificaciones importantes al método con el fin de obtener una síntesis reproducible y en un menor tiempo. El proceso se detalla más adelante. Todos los reactivos y solventes fueron adquiridos de Sigma Aldrich y preparados en el laboratorio de materiales nanoestructurados del complejo CICSaB de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí; el equipo de laboratorio empleado es detallado más adelante.

Las aplicaciones potenciales de los nanomateriales dependen de sus propiedades físicas, y dichas propiedades dependen a su vez del proceso de síntesis. Por lo tanto, elegir la ruta sintética correcta y apropiada es el primer paso hacia el desarrollo de las NPs deseadas. Dos tipos de métodos son mayormente utilizados para la síntesis de nanopartículas, la síntesis física (o también llamadas de arriba a abajo) y la síntesis química (también llamadas de abajo hacia arriba).

Síntesis Física

En este método, se aplica una gran fuerza para triturar una partícula grande en partículas más pequeñas. Esto se puede lograr mediante el uso de técnicas de trituración, molienda, corte litográfico, deposición química de vapor y deposición física de vapor. Este enfoque se utiliza para la producción de nanopartículas de base metálica y nanopartículas de cerámica⁷³. Las principales ventajas de esta síntesis son que el resultado final tiene una alta pureza, no se necesitan lavados y los parámetros de síntesis afectan directa y proporcionalmente al resultado; las desventajas son que se necesitan equipos más costosos y una sola síntesis puede llegar a ser relativamente más costosa que su contraparte química.

Síntesis Química

Este método también se conoce como el proceso de construcción. Con esta técnica, se utilizan partículas pequeñas como átomos o moléculas para la síntesis de partículas más grandes, donde el ensamblaje de varias partículas pequeñas conlleva a la producción de una partícula compleja. Esto se puede hacer mediante métodos de hilado, síntesis verde, síntesis

bioquímica y sol-gel. Las nanopartículas verdes y sintetizadas bioquímicamente son rentables y ecológicas. Este enfoque se utiliza para la producción de nanopartículas de óxido metálico y nanoesferas metálicas⁷³. Las ventajas de este método de síntesis son que los costos son relativamente menores en contraste con los métodos físicos, no se necesitan equipos muy sofisticados ni costosos, en algunos casos la superficie del resultado final puede quedar con ligandos que sean favorables para su propósito, por ejemplo, que tenga baja o nula toxicidad; las desventajas son que en la gran mayoría de los casos se necesitan hacer uso de diversos lavados y filtraciones para obtener el resultado deseado y en este proceso se pierde material, también esta síntesis es muy sensible a los parámetros iniciales y un ligero cambio afecta al resultado final, por ende la escalabilidad es complicada.

Un diagrama de los dos métodos de síntesis se muestra en la Fig. 8.

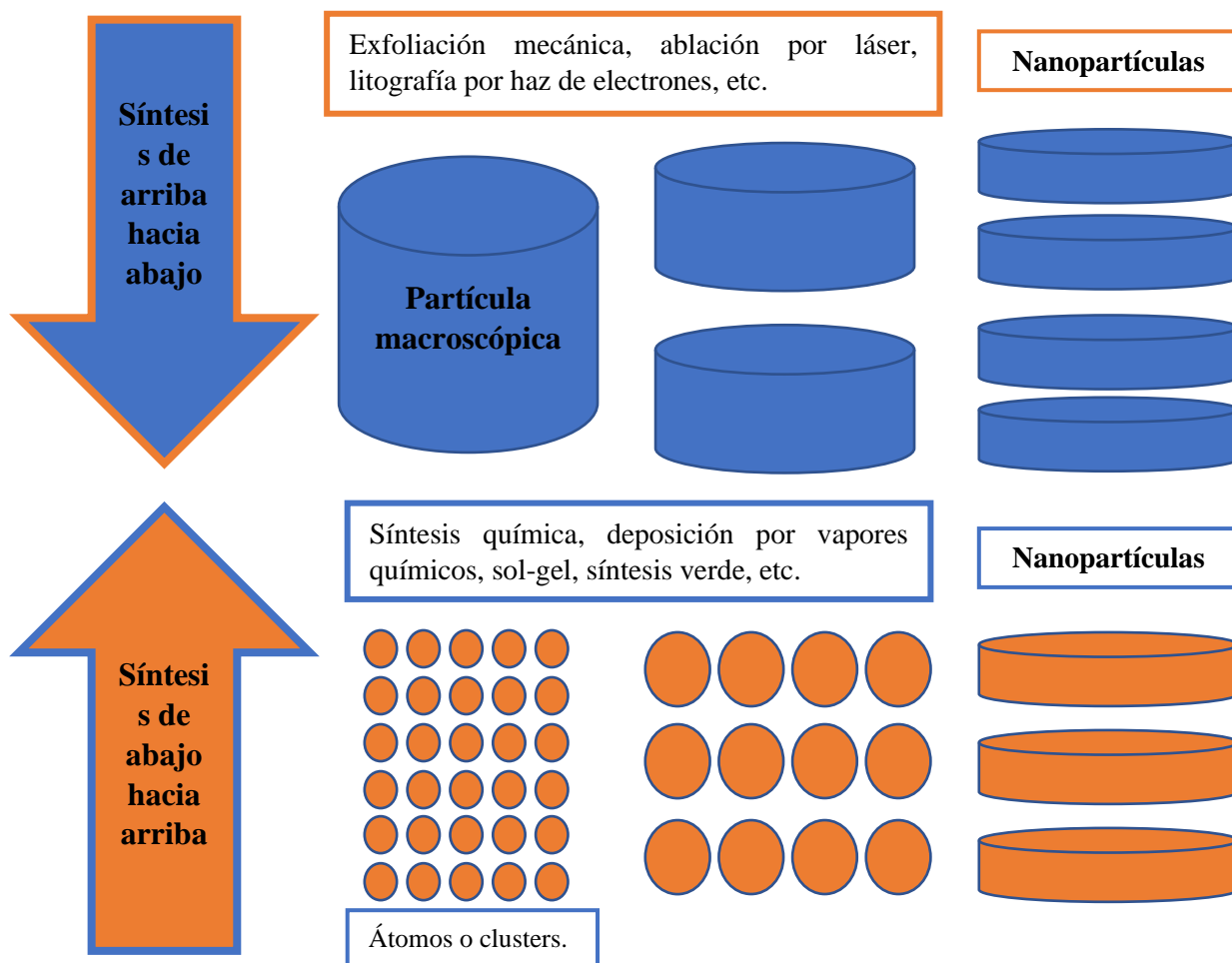


Figura 8. Los dos tipos de rutas para sintetizar nanopartículas.

Para cumplir con el objetivo de este trabajo, diversas síntesis son requeridas, estas síntesis deben ser de bajo costo, con alta reproducibilidad y con la capacidad de variar los parámetros iniciales a fin de obtener NPs con propiedades novedosas, por ello en este trabajo se utilizó una síntesis química, específicamente una técnica de química húmeda, la cual consiste en formar núcleos metálicos que sirven como semillas para las NPs. En este tipo de técnicas siempre están presentes 3 elementos importantes, los precursores metálicos, los agentes reductores, los agentes estabilizantes o envolventes.

4.1.1 Protocolo de síntesis

El protocolo que se empleó para sintetizar las NPs es el resultado de una modificación a un protocolo previamente reportado¹¹, quiero enfatizar que es del equipo del Dr. Yacamán y que ellos fueron los primeros en lograr este tipo de síntesis en aleación y esta forma de estrella, las NPs sintetizadas mediante este protocolo tienen tamaños promedio de 300 nm y una morfología estrellada de cinco brazos. Dicho protocolo de síntesis tiene la característica cualitativa de ser fácilmente reproducible en un tiempo corto de síntesis, en comparación a otros protocolos del mismo tipo, además de ser un protocolo con un bajo costo, asimismo, con reactivos de baja toxicidad ambiental que en consecuencia representan un bajo riesgo para el sintetizador y para el medio ambiente.

Para la síntesis se requirieron los siguientes reactivos: los precursores de las NPs los cuales fueron dos soluciones metálicas de cloruro de cobre (CuCl_2) y ácido cloro áurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), el agente reductor, en este caso la glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) fue empleada como un reductor débil que aportó de forma gradual electrones al sistema lo que causó la reducción de las semillas metálicas hacia nanopartículas. Por último, el agente estabilizante, la hexadecilamina ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{NH}_2$), que se empleó para inhibir el crecimiento excesivo de las NPs y también propició la consolidación de sus morfologías.

Durante este trabajo, la modificación del protocolo reportado por Lourdes Bazán et al¹¹ consistió agilizar el procedimiento para disolver el agente estabilizante, en este caso hexadecilamina (HDA) la cual fue disuelta completamente en agua desionizada; para conseguir esto se usó un baño ultrasónico, según reportaron Lourdes Bazán y colaboradores¹¹ el tiempo necesario para completar su disolución es de 30 min, y se obtiene una emulsión como se muestra en la figura 9.



Figura 9. Emulsión de HDA y agua desionizada generada a partir de un precalentamiento del baño ultrasónico.

En los siguientes subtemas se abordará más a detalle los materiales y reactivos utilizados, así como también una metodología detallada de la síntesis.

4.1.2 Materiales y Reactivos

Para la síntesis se requirieron los siguientes materiales de laboratorio: una charola estéril para pesar, una espátula metálica, un vial de fondo redondo con tapa de 40 mL, una barra de agitación magnética de 12 mm de largo, un cristizador de 1500 mL, aceite mineral (también se pudo haber sustituido por etilenglicol o cualquier otro líquido transparente, el cual su punto de ebullición esté por encima de los 100°C) y finalmente, un vial estéril para el envasado del material resultante.

Se requirieron además los siguientes equipos de laboratorio previamente calibrados y limpios: una micropipeta de 100 μ L con sus respectivas puntas, una balanza analítica de laboratorio con precisión de hasta 10^{-4} g, un baño ultrasónico Elmasonic S15H con un rango de operación de 50/60 Hz y con la posibilidad de ajustar la temperatura (50°C), y dos placas de calentamiento con agitación.

Los reactivos que se utilizaron en la síntesis se muestran de forma detallada en la siguiente tabla:

Tabla 1. Reactivos que se emplearon en la síntesis de las NPs bimetalicas Au-Cu.

Nombre de etiqueta	Fórmula Química	Pureza	Fabricante	Características
Gold (III) chloride hydrate	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	99.996%	Sigma Aldrich	Polvo fino color amarillo
Copper (II) chloride	CuCl_2	97%	Sigma Aldrich	Polvo fino color marrón oscuro
Hexadecylamine	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{NH}_2$	90%	Sigma Aldrich	Cristales finos color blanco
D-(+)-glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	$\geq 99.5\%$	Sigma Aldrich	Polvo grueso color blanco
Deionized water	H_2O	$5.17\mu\Omega/\text{cm}$	Sigma Aldrich	Líquido inodoro, incoloro

Los reactivos antes mencionados se dispusieron en base al protocolo original, en cuanto a la solución de los precursores metálicos, se calculó y preparó una solución 1 M en agua desionizada de cada uno, como se muestra en la figura 10. De la misma manera, la solución de glucosa se preparó a 1 M, sin embargo, para el caso de la solución de glucosa, una nueva solución fue preparada para cada síntesis, es decir, la solución de glucosa siempre fue fresca.



Figura 10. Soluciones de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y CuCl_2 respectivamente a una molaridad de 1 M.

4.1.3 Metodología de síntesis

Para una visualización ordenada, se dividió la metodología de síntesis en 4 pasos clave.

Posteriormente se hicieron 11 diferentes tipos de síntesis con esta misma metodología, para las cuales se modificaron en cada una de ellas la relación molar entre los precursores metálicos, la relación molar se escogió de modo que abarque todo el rango de la aleación bimetalica con pasos bien definidos.

Paso 1: Disolución de HDA en agua desionizada

Se precalentó un baño ultrasónico marca Elmasonic S15H a 50 °C (este paso es indispensable para que se haya logrado disolver el agente estabilizante). En el vial de fondo redondo de 40 mL se añadieron 45 mg de HDA y 4 mL de agua desionizada, se pasó al baño ultrasónico precalentado y se dejó durante 30 minutos para que se disolviera completamente, ya pasado ese tiempo se formó una emulsión, como se muestra en la figura 9 en la cual se puede apreciar una solución de color blanco y espesa debido al efecto Tyndall. Después, se le añadió la barra de agitación magnética al vial y se transfirió a la placa de agitación magnética durante 20 minutos a 1000 rpm, durante este paso es removido cualquier grumo que no se haya disuelto.

Paso 2: Adición de los precursores metálicos

A la emulsión formada en el paso 1 se agregaron los siguientes reactivos, la emulsión fue mantenida en agitación en todo momento, los reactivos se añadieron en este orden: primero se agregaron 150 μL de CuCl_2 [0.1 M], como se muestra en la figura 11, se observa un cambio de color de la solución de blanco a un color azul; después se agregaron 150 μL de HAuCl_4 [0.1 M] y como se muestra en la figura 12, se observó un cambio de color de la solución a un tono verdoso; el sistema se dejó en agitación magnética por 10 minutos más a 1000 rpm, lo cual garantizó que los iones metálicos entraran en contacto antes de la nucleación. Debido a la correspondencia entre volúmenes y molaridades de los precursores, se manejó como base estándar que se mantuvieran constantes el número total de moles en las posteriores síntesis, ésta primera síntesis correspondió a una relación molar de Au-Cu [1:1], figura 12.

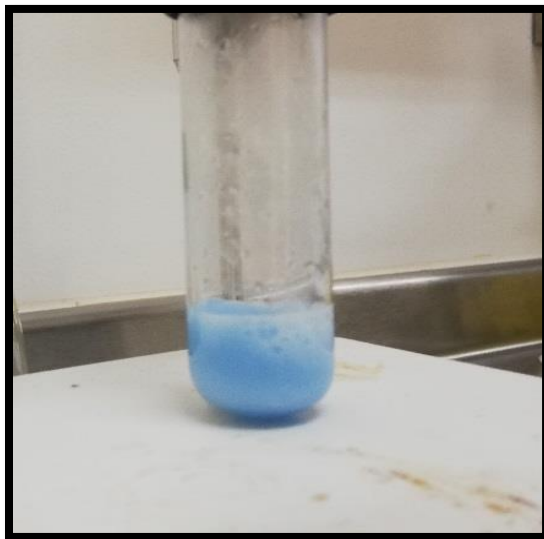


Figura 11. Suspensión al agregar 150 μL de CuCl_2 [0.1 M].

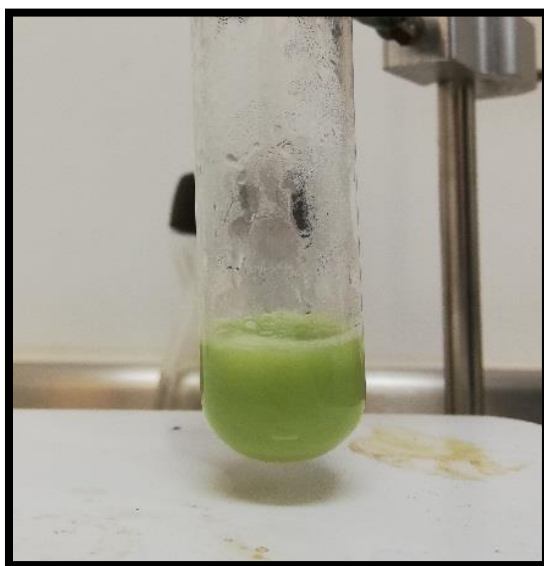


Figura 12. Suspensión al mezclar 150 μL CuCl_2 [0.1 M] y 150 μL HAuCl_4 [0.1 M].

Paso 3: Nucleación

Para llevar a cabo la nucleación para la formación de las nanopartículas primero se precalentó un baño de aceite mineral a 100°C , una vez que se alcanzó esta temperatura y además se

mantuvo estable, el vial con la solución obtenida en el paso dos se sumerge en el baño caliente durante 4 minutos con una agitación magnética de 600 rpm, durante ese tiempo se observó una transición de colores generada a partir de la oxidación por temperatura de la HDA, que pasó desde el color verde, blanco y finalmente a un color azul cielo como se indica en la figura 13. Este color es una evidencia de la formación de núcleos de unos cuantos nanómetros de dimensión. Dichos núcleos son pequeños “clusters” llamados semillas, los cuáles indican el inicio del proceso de nucleación. Cuando se genera la nucleación es el momento en que el crecimiento de la nanopartícula debe ser potenciado, por esta razón, inmediatamente después del cambio de coloración que se da en el minuto 4, se inyectaron 300 μL de Glucosa fresca al 1 M.

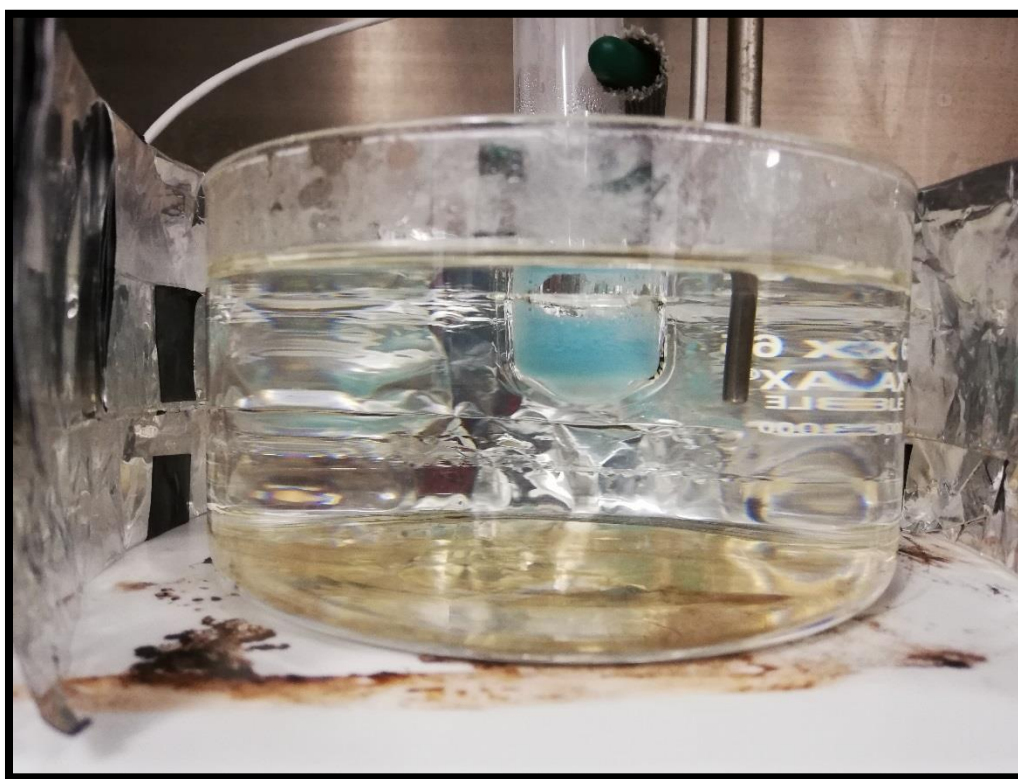


Figura 13. Cambió de coloración a un azul claro indicativo de la nucleación.

Paso 4: La formación de las nanopartículas

Una vez agregada la Glucosa fresca al 1 M, la suspensión continuó en agitación durante 30 minutos más a la misma temperatura. Durante el transcurso de ese tiempo se observó que la suspensión coloidal formada iba cambiando a una coloración cada vez más oscura hasta que aterrizó en un color negro purpúreo como se muestra en la figura 14. Esta coloración es indicativa de la formación de nanopartículas bimetálicas. Una vez pasado el tiempo la suspensión fue retirada del baño caliente y fue puesta en reposo. La figura 15 muestra un diagrama de los pasos de la síntesis aquí descrita.



Figura 14. Coloración final de la suspensión coloidal que contiene nanopartículas bimetálicas de Au-Cu.

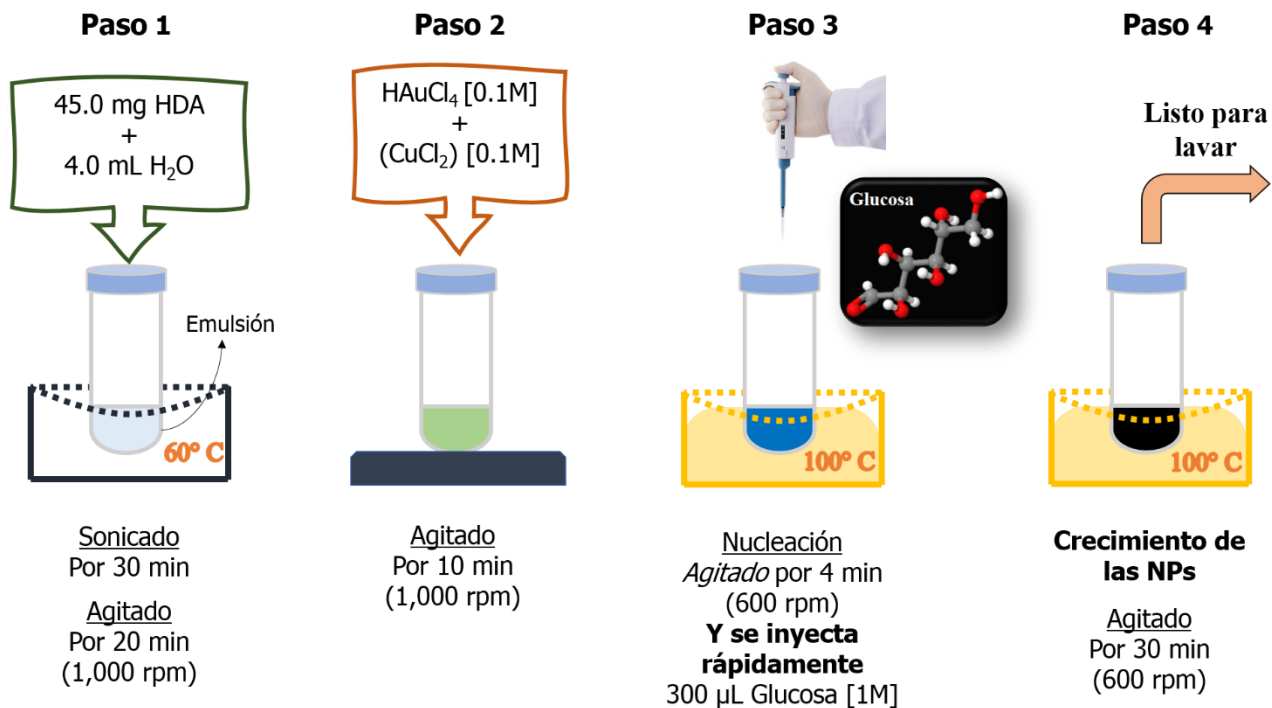


Figura 15. Los 4 pasos de la síntesis esquematizados.

4.1.4 Lavado de NPs

Para retirar el excedente de HDA y Glucosa de la suspensión se hicieron a cada muestra 10 lavados con agua desionizada y 2 lavados con isopropanol al 99.90 %.

Los lavados consistieron en aforar a 10 mL la solución resultante de la síntesis con el diluyente indicado usando un tubo falcon de 15 mL, se agitó y sonicó durante 5 min para que las NPs se incorporaran al medio y posteriormente se realizó una centrifugación en una centrifugadora de ángulo fijo marca Sartorius modelo Centrisart* D-16C por 5 min a 11,000 rpm (Figura 16), enseguida se retiró el sobrenadante y se volvió a aforar, este proceso fue repetido hasta que al momento de agitar la solución ya no se observaran grumos, burbujas o signos de algún otro agente externo a las NPs.



Figura 16. Centrifugadora Sartorius usada en los lavados.

4.1.5 Metodología de las siguientes síntesis

De acuerdo con los objetivos del proyecto en los que se pretende sintetizar nuevas NPs de Au-Cu manteniendo los mismos parámetros al del protocolo mencionado en el apartado 4.1.3 pero con la diferencia de modificar los valores iniciales de los precursores metálicos, se realizaron **11 diferentes síntesis** con la lógica de que se pudieran ordenar las síntesis en una escala simétrica, definida y representativa tras modificar un parámetro de la síntesis y manteniendo los demás parámetros iguales.

Se escogió cambiar el parámetro de los precursores metálicos debido a que los otros parámetros de la síntesis como lo son la temperatura, la concentración del agente de cobertura (*capping agent*) o la concentración del agente reductor ya han sido estudiados en otros trabajos los cuales se mencionan en el “capítulo 2: Estado del arte”.

En base a la lógica anterior se eligió por mantener un número de moles totales fijos a 1M en la síntesis y solamente se modificó las relaciones molares de los precursores metálicos de oro

y cobre de manera que se pudieran obtener síntesis en pasos graduales al porcentaje molar de cada metal. De manera que, para poder obtener el mayor número de síntesis representativas posibles, se escogió dividir el rango entre el oro y el cobre en 11 diferentes escalamientos:

Tabla 2. Las 11 diferentes síntesis de AuCu con su respectivo porcentaje molar de Au.

Número de síntesis	Porcentaje molar de Au
1	100
2	91.66
3	83.33
4	75
5	66.66
6	50
7	33.33
8	25
9	16.66
10	8.33
11	0

Como se puede apreciar en la tabla 2, las síntesis se escalaron de forma gradual al porcentaje molar de oro, resultando en 11 diferentes síntesis que van desde un porcentaje de 0 a 100.

De modo que para cada una de las 11 síntesis correspondió una relación molar Au:Cu diferente. Ya que se definió como valor fijo el número de moles a **1 M** y teniendo en cuenta que la fórmula de la molaridad es $M = n/V$ donde “M” es la molaridad, “n” el número de moles y “V” el volumen en unidades de litro (L) entonces el número de moles depende únicamente del volumen. Tomando en cuenta que el volumen usado para los precursores metálicos del protocolo mencionado en el apartado 4.1.3 es a **300 µL** se tiene que las relaciones molares de los precursores son directamente proporcionales al volumen fijado. Es decir, que para la síntesis al 100% de oro equivale a una relación molar 1:0 de Au:Cu y para esta relación molar se usaron 300 µL de una solución 1M de H_{AuCl}₄, de igual manera para un porcentaje de oro al 75% en la síntesis equivale a una relación molar 3:1 de Au:Cu los

cuáles en volumen son 225 μL de HAuCl_4 y 75 μL de CuCl_2 ambos al 1M. Bajo estas condiciones se hicieron las 11 diferentes síntesis esquematizadas en la tabla 3 y que para efectos prácticos se les asignó el nombre a cada síntesis por la relación molar que tenían.

Tabla 3. Las 11 diferentes síntesis llevadas a cabo en las que se variaron las relaciones molares de los precursores metálicos.

N°	Au (vol. en μL)	Cu (vol. en μL)	Relación Au : Cu	% Au
1	300	0	1 : 0	100
2	275	25	11 : 1	91.66
3	250	50	5 : 1	83.33
4	225	75	3 : 1	75
5	200	100	2 : 1	66.66
6	150	150	1 : 1	50
7	100	200	1 : 2	33.33
8	75	225	1 : 3	25
9	50	250	1 : 5	16.66
10	25	275	1 : 11	8.33
11	0	300	0 : 1	0

La tabla 3 muestra las 11 diferentes síntesis que se hicieron en este proyecto, a cada síntesis le corresponde una relación molar de los precursores metálicos diferente y los demás parámetros de síntesis se mantuvieron fijos. Se tomó como referencia el porcentaje molar de Au presente en la síntesis como se puede apreciar en la última columna. Además de esto la síntesis número 6 se remarca en verde pues es la síntesis original usada en el protocolo del apartado 4.1.3.

Para cada una de las 11 síntesis se tomó evidencia fotográfica antes y después de la formación de las NPs. Antes de la formación de las NPs lo que se tiene en el tubo de ensayo es la emulsión coloidal entre la mezcla de las soluciones metálicas y el tensoactivo (HDA), en este punto existe un cambio de coloración por las sales metálicas que va desde un naranja cuando el porcentaje de oro es del 100% hasta un azul cuando no hay presencia de oro y por ende el porcentaje de cobre es del 100%, entre ambos extremos las síntesis intermedias adquieren tonalidades entre naranja y azul como se muestra en la figura 17.

Las 11 síntesis tras agregar las sales metálicas a la emulsión (paso 2)

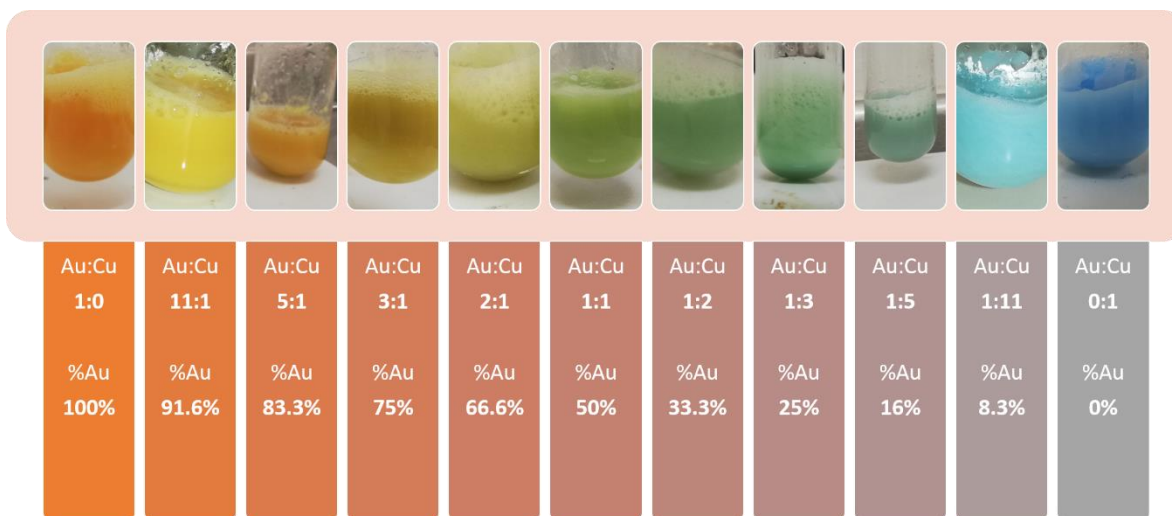


Figura 17. Representación gráfica de las 11 diferentes síntesis y la coloración propia de la mezcla de ambas sales metálicas antes de la nucleación.

Después del paso 2 el sistema coloidal es sometido a un incremento de temperatura es entonces cuando comienza la nucleación y tras agregar el agente reductor (glucosa) comienza la formación de NPs, con este cambio el sistema coloidal llega a su coloración final. Esta coloración está esquematizada para cada síntesis en la figura 18.

Las 11 síntesis tras agregar el agente reductor y la formación de NPs (paso 4)

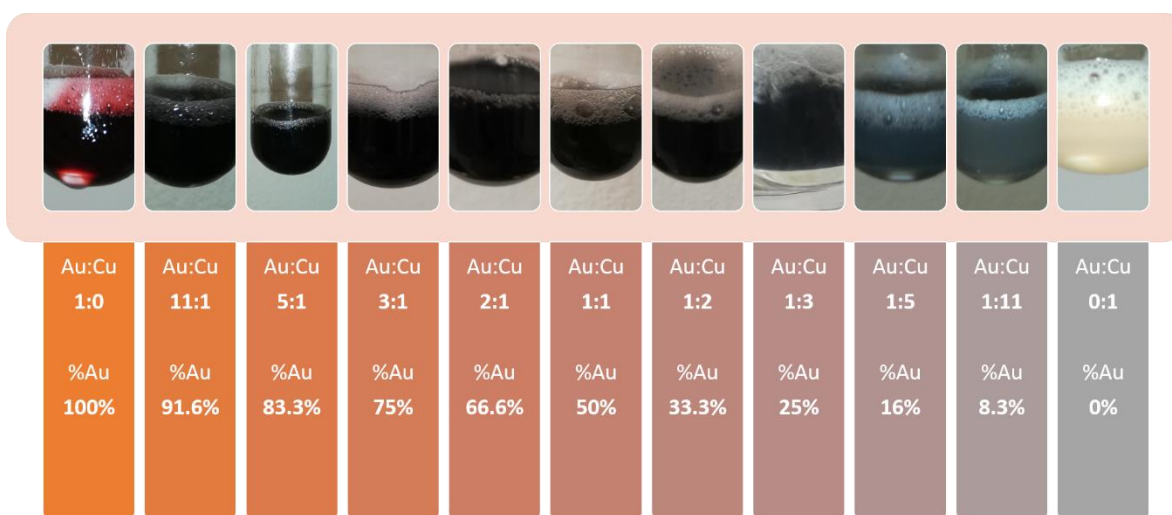


Figura 18. Representación gráfica de las 11 diferentes síntesis y la coloración adquirida una vez formadas las NPs previo a los lavados.

Como se esquematiza la figura 18 la coloración última de las síntesis fue desde un color rojo oscuro para la síntesis con un porcentaje de Au del 100% lo cual es un color complementario indicativo de un pico de absorción electromagnética alrededor de los 550 nm propios de NPs con tamaños de alrededor 30 nm de diámetro con morfología esférica y de composición Au en suspensiones acuosas^{39,52}, después pasando por tonos grises oscuros los cuales indicaron una absorción electromagnética en el cercano infrarrojo (NIR) para síntesis similares de Au-Cu^{74,75}, finalmente, la última síntesis que contiene el 100% del precursor metálico de cobre y nada de oro adquirió una coloración blanca el cual es un color complementario que indicó una absorción en el rango ultravioleta (UV) del espectro electromagnético⁷⁶.

Tras obtener las nuevas síntesis se les hicieron los lavados correspondientes a la metodología descrita en el apartado 4.1.4, y finalmente se les hicieron las caracterizaciones planteadas en los objetivos del capítulo 3.

4.2 Metodología de la caracterización de las nanopartículas de Au-Cu.

4.2.1 Espectroscopía Uv-Vis-IR

4.2.1.1 Características principales

La espectroscopía UV-Vis se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética (en el rango de longitudes de onda del ultravioleta y visible) que puede absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente.

La proporcionalidad entre intensidad de luz absorbida o transmitida y la concentración de analito está definida por la ley de Lambert-Beer. Esta ley se cumple para cualquier proceso de absorción en cualquier zona del espectro y se basa en que cada unidad de longitud a través de la cual pasa la radiación absorbe la misma fracción de radiación. Si tenemos un haz de luz monocromática, “ I^0 ”, que pasa a través de un material de espesor, “ l ”, la disminución de la intensidad de luz transmitida, “ I ”, será proporcional al camino recorrido y a la concentración de la sustancia absorbente, “ C ”.

$$I = I^0 e^{-\epsilon l C}$$

El factor de proporcionalidad, “ ϵ ”, se denomina absorptividad molar y está relacionado con la probabilidad de absorción de radiación por parte de la sustancia en análisis. Tomando logaritmos y reorganizando la ecuación tenemos:

$$\ln\left(\frac{I^0}{I}\right) = \epsilon l C$$

donde “ $\ln(I^0/I)$ ” se denomina absorbancia (A).

4.2.1.2 Metodología usada para medir el espectro de absorción de cada síntesis.

El comportamiento óptico de las NPs sintetizadas en este trabajo se determinó usando un equipo UV-Vis-IR de la marca Shimadzu (figura 19), este equipo tiene la capacidad de incidir sobre la muestra con luz de longitudes de onda que van desde los 200 nm hasta los 3000 nm, por lo que puede medir absorbancias en un rango muy amplio del espectro electromagnético.

La absorbancia propia del sistema coloidal (NPs + agua) es obtenida con este equipo. Esta absorbancia obedece la ley de Lamber-Beer.

La preparación de las muestras consistió en diluir los lavados de las 11 síntesis en agua, de forma que todas las diluciones se aproximaran a la misma cantidad de muestra por volumen, una vez se obtuvieron las diluciones se procedió a depositar 3 mL de las muestras en las celdillas de cuarzo propias del equipo y se midió en un rango de 200 a 1500 nm.



Figura 19. Espectrofotómetro UV Vis IR

4.2.2 Potencial Z

4.2.2.1 Características principales

Una característica importante de un coloide es la carga superficial de las partículas dispersas. La síntesis de las NPs bimetálicas de Au-Cu descritas en la sección 4.1 dio como resultado un coloide en donde la fase dispersa son las NPs sintetizadas y la fase dispersante es agua desionizada.

La definición de Lyklema de un **coloide** se entiende como una mezcla en la que una sustancia de partículas insolubles que tienen tamaños entre 1 nm y 1 mm en al menos una de sus dimensiones que están dispersas microscópicamente en otra sustancia. Las entidades presentes pueden ser sólidas, líquidas o, en algunos casos, incluso gaseosas. Y están dispersas en el medio, el cual puede ser también puede ser sólido, líquido o gaseoso⁷⁷. Las partículas o entes son llamadas la “fase dispersa” y el medio en el que están dispersas es llamada la “fase dispersante”⁷⁸.

Un método eficaz para medir la carga superficial de las partículas consiste en aplicar un campo eléctrico a la suspensión y medir que tan rápido se mueven las partículas como resultado del mismo. Ese proceso se llama “electroforesis”⁷⁹. Este proceso se basa en el modelo de la doble capa de Helmholtz⁸⁰ el cual está representado en la figura 20.

El valor del potencial electrostático es función de la distancia desde la superficie de la partícula hacia afuera, cerca de la superficie de la partícula el valor cambia muy rápidamente por la primera capa de contraiones que son atraídos por fuerzas coulombicas y luego cambia casi de manera exponencial a través de la capa difusa. La unión entre las cargas de la capa envolvente y la capa difusa se caracteriza de nuevo un discontinuo en el potencial electrostático. Esta superficie, que separa la carga estática de la carga difusa alrededor de la partícula, se llama superficie de cizalladura o superficie de deslizamiento. El potencial electrostático presente en dicha superficie, se le llama potencial zeta y es el potencial que se cuantifica al medir la velocidad de las partículas en un campo eléctrico.

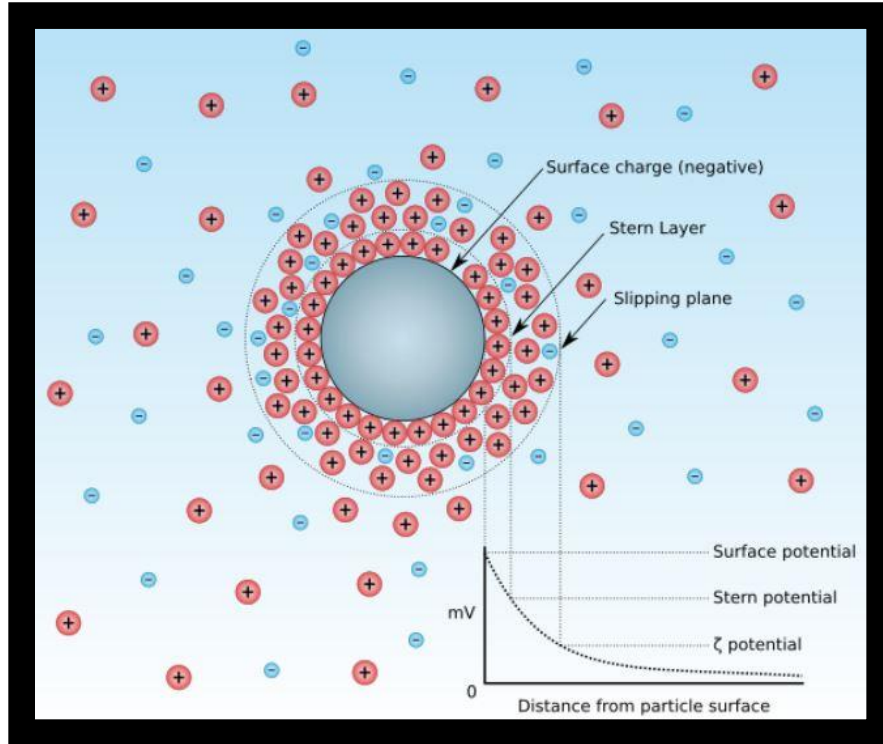


Figura 20. Representación del modelo de la doble capa para visualizar una partícula cargada⁸¹.

Este potencial Z además de darnos un valor de la carga superficial de las partículas también da una cuantización de la repulsión electrostática entre partículas coloidales suspendidas, es decir, que tan estable es el coloide. Un coloide inestable es aquel en el que las partículas tienden a agregarse y sedimentarse⁸².

El potencial Z puede adquirir determinados valores, positivos o negativos, de acuerdo al signo de la carga que portan las partículas coloidales. Si el valor del potencial Z está por debajo o encima del intervalo de -60 mV a 60 mV, la estabilidad de las partículas coloidales será excelente, lo que significa que permanecerán dispersadas sin agregarse. En cambio, aquellas partículas que tengan un valor del potencial Z entre -10 mV y 10 mV, serán propensas a aglomerarse; siempre y cuando no estén recubiertas por unas películas de moléculas ancladas covalentemente a sus superficies. Se dice entonces que se “rompe” el estado coloidal⁸³.

4.2.2.2 Metodología usada para encontrar el potencial Z de cada síntesis.

Se usó un equipo Zeta Sizer Nanoseries de la marca Malvern Panalytical como se muestra en la figura 21. El equipo funciona haciendo pasar un voltaje a través de una celda que contiene el analito a identificar, las muestras generalmente son un coloide, siendo conocidas las constantes dieléctricas del medio y de los componentes presentes en el coloide, el equipo proporciona información correspondiente al potencial Z del coloide. El potencial Z arrojado proviene del modelo de la doble capa de Gouy-Chapman-Stern usado para coloides, es por ello que en general se tiene un promediado de la carga superficial de las nanopartículas dispuestas en el coloide. Para la medición se usaron 1.5 mL de las NPs por cada síntesis, previamente dispersadas y sonicadas en agua desionizada, después se introdujeron en la celdilla propia del equipo y se establecieron en el software los parámetros tales como la constante dieléctrica del medio y de las partículas por cada medición.



Figura 21. Zeta Sizer Nanoseries de la marca Malvern Panalytic

4.2.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

4.2.3.1 Características principales

Para determinar la morfología de las NPs se empleó un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés) marca Jeol JEM 2100 como se muestra en la figura 22, el cual funciona generando un haz de electrones que posteriormente pasa por electroimanes que análogamente a un microscopio óptico funcionan como lentes que enfocan el haz, y lo hacen incidir sobre una rejilla especial muy fina a la cual previamente se le depositó la muestra a medir, y el haz se transmite a través de esta rejilla a lo cual un detector espera observar los electrones transmitidos y hacer un conteo de ellos que posteriormente el software lo interpretará como una imagen.

4.2.3.2 Metodología usada para la preparación de las muestras del TEM.

Para la preparación de las muestras se usaron las NPs que fueron lavadas con isopropanol, estas muestras se sonicaron durante 15 minutos y posteriormente fueron depositadas por goteo sobre una rejilla de níquel con un tamaño de malla de 200 mesh para TEM. El volumen de la gota fue de 10 μ L. Una vez depositada la gota se dejó secar en un ambiente estéril durante 2 horas a modo de eliminar cualquier rastro de líquido.

Una vez lista la rejilla con la muestra de NPs depositada, se prosiguió a medirla en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 2100 y obtener las micrografías representativas de cada síntesis.



Figura 22. Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol JEM 2100

4.3 Prueba SERS

Un experimento SERS requiere una cuidadosa consideración del analito a medir, del sustrato SERS en cuestión y la configuración óptica del equipo para que pueda garantizar la máxima generación y mejora de la señal, la técnica es una poderosa herramienta no destructiva que determina la identidad química y la información estructural a partir de una pequeña concentración molecular del analito.

El primer parámetro que se tuvo en cuenta es la elección del sustrato SERS. Los sustratos tienen diferentes variables a considerar como lo puede ser su estructura nanométrica que va desde nanoesferas, coreshell, o nanobarras hasta soluciones coloidales tridimensionales, las cuáles pueden llegar a tener uno o varios plasmones de resonancia según su morfología, y también debido a su morfología la distribución electromagnética al incidir una fuente de excitación sobre estos, tiene diferentes puntos de concentración del campo eléctrico dependiente de la morfología. Otra variable es la composición, la cual se trata de metales nobles como lo son el Au, la Ag y el Cu y puede ser nanomateriales de un solo elemento o una aleación de estos, la composición influirá en la síntesis, y la morfología final adquirida, también en el comportamiento químico y eléctrico los cuales pueden ser descritos por la función dieléctrica y finalmente también afecta a la interacción sustrato-analito. Otra variable muy importante es el tamaño de la NP pues las resonancias de los plasmones se pueden ajustar según los tamaños de las NPs.

De las 11 diferentes síntesis se tomaron en cuenta las diferentes variables que cada síntesis de Au-Cu presentó, y se tuvo a escoger usar como **sustrato SERS las NPs bimetálicas de Au:Cu relación molar 3:1**, ya que sus características son compatibles con la carga superficial del analito y con los parámetros ópticos escogidos; en la sección de discusión se tratará con más detalle la elección del sustrato SERS.

El segundo parámetro en la prueba SERS que se tuvo en cuenta es el propio analito a medir, la teoría indica que la región efectiva de realce se da en la superficie del sustrato y entre más alejado se encuentre el analito, menos efecto tendrá el realce, teóricamente disminuye extremadamente rápido el realce con la distancia (r^{-10} para esferas), por ende, se busca que el

sustrato SERS con el analito tengan afinidad a encontrarse próximos por ejemplo por fuerzas electroquímicas.

El analito que se midió fue la molécula de imidazol (IMZ), esta es una molécula aromática pequeña que tiene carga formal neutra y es altamente soluble en agua, por sus características se optó por hacer una medición en seco, sobre un sustrato de aluminio. Se prepararon 6 diferentes concentraciones molares del analito: **1M, 10^{-3} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M de la molécula de IMZ.**



Figura 23. MicroRaman HORIBA XploRA PLUS

Finalmente, el último parámetro a considerar fue la fuente de excitación, la teoría indica que el mayor realce se da cuando el láser (fuente de excitación) tiene un ligero corrimiento al azul con respecto al pico máximo del plasmón superficial de resonancia (propio del sustrato SERS); es por ello, que se escogió usar un láser rojo con una longitud de onda de 785 nm. Siguiendo el objetivo de la tesis, en la sección de discusión se detalla porque la elección de este láser y la importancia de llevar a cabo diferentes pruebas de las convencionales con el láser verde de 532 nm. El equipo que se utilizó fue un micro Raman marca HORIBA modelo XploRA PLUS como se muestra en la figura 23.

Entonces, la metodología de la prueba SERS se hizo de la siguiente manera:

1. Se depositaron sobre un sustrato de aluminio $40\ \mu\text{L}$ de la solución coloidal de NPs Au:Cu relación molar 3:1 y se dejó secar. Se repitió el proceso unas 6 veces en diferentes zonas del sustrato de aluminio.
2. Se depositaron sobre las gotas secas de NPs, $40\ \mu\text{L}$ de las 6 diferentes concentraciones molares de IMZ, y se dejó secar.
3. En el equipo de micro Raman se escogieron las áreas de interés, y se midió usando el láser de $785\ \text{nm}$.



Figura 24. Representación gráfica de la disposición del sustrato SERS la cual es una fina capa de NPs Au-Cu relación molar 3:1 sobre un sustrato de aluminio (paso 1), del analito SERS el cual es IMZ que va desde 1M hasta 10^{-9} molar (paso 2), y una vez seco la mezcla sobre el sustrato de aluminio se hizo una medición Raman (paso 3).

La figura 24 esquematiza los pasos en los que se llevó el proceso experimental de la prueba SERS.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos de las caracterizaciones de las NPs sintetizadas durante este trabajo. Finalmente, se muestran los espectros Raman y el factor de realce obtenidos de la prueba SERS descritos en el apartado 4.3.

5.1 Potencial Z

Tabla 4. El potencial Z correspondiente a cada una de las 11 síntesis

Muestra Relación molar Au:Cu	Potencial Z	pH
1:0	49.3 ± 10.1 mV	7
11:1	31.2 ± 7.82 mV	7
5:1	26.2 ± 6.88 mV	7
3:1	39.5 ± 6.52 mV	7
2:1	34.3 ± 9.37 mV	7
1:1	39.5 ± 7.32 mV	7
1:2	42.1 ± 7.54 mV	7
1:3	41.1 ± 6.81 mV	7
1:5	38.5 ± 7.95 mV	7
1:11	48.7 ± 8.90 mV	7
0:1	60.0 ± 13.1 mV	7

En la tabla 3 están resumidos los potenciales Z de las 11 síntesis realizadas, todas en solución acuosa y a un pH neutro. Se puede apreciar que todos los valores son positivos en un medio acuoso lo cual corresponde con la literatura, para coloides metálicos.

Otro punto importante es que el valor absoluto de los potenciales Z, en su mayoría tienen valores por encima de 30 mV lo cual indica una buena estabilidad coloidal, es decir, que no tienden a precipitarse.

Desde este punto se mostrarán solo los resultados obtenidos de las síntesis que tienen un porcentaje de Au mayor o igual al 50 %, por 2 razones, la primera es que para que estas partículas se consideren como sustrato SERS en este trabajo, las partículas deben de absorber en la región del NIR debido a que, para la prueba de SERS se usa como fuente de excitación un láser de 785 nm, y sólo las síntesis con un porcentaje de Au mayor al 50% tienen absorción en el NIR como se aprecia en la sección 5.2 UV-Vis. La segunda razón se debe a que se buscan potenciales Z superiores a 30 mV o más, debido a la estabilidad coloidal. Entre las posibles síntesis a considerar son las de relación molar Au:Cu 1:0, 3:1 y 1:1 ya que son las de mayor estabilidad coloidal. Sin embargo, se descarta la que tiene un 100% de Au ya que, esta investigación se centra en las partículas bimetálicas y además porque las NPs de Au no absorben en el NIR.

Por lo que hasta ahora se discriminan 9 síntesis y solo las dos restantes serán consideradas como sustratos SERS, la de relación molar Au:Cu 1:1 y la 3:1.

5.2 UV-Vis

Acorde con uno de los objetivos de este trabajo que es sintetizar las NPs bimetálicas de Au-Cu que se utilizan como sustrato SERS, las caracterizaciones van de acuerdo a escoger la síntesis con mejores características (descritas en capítulo 2) para ser candidata a sustrato SERS acorde con el analito de imidazol.

Por otra parte, se pretende demostrar que este tipo de aleación de NPs se puede sintonizar para diferentes fuentes de excitación, no solamente la fuente convencional utilizada en equipos Raman de 532 nm de longitud de onda, sino también fuentes en la región del Ultra Violeta (láseres utilizados para sondear propiedades específicas de la muestra y beneficiarse de propiedades experimentales diferentes de las mediciones típicas del Raman visible, por ejemplo, una mayor eficiencia de dispersión Raman, una penetración láser modificada dentro de la muestra y acoplamiento de resonancia para fracciones químicas diferentes, con longitudes de onda comerciales de 355 y 442 nm)⁸⁴ y del Infra Rojo (láseres para aplicaciones biológicas, con longitudes de onda comerciales de 785 y 1064 nm)⁸⁵. Es por ello que, los plasmones de resonancia superficiales (LSPR) de las NPs con una mayor absorción en las regiones del espectro electromagnético que coincidan con los láseres de excitación, son deseables.

Al ser el imidazol (IMZ) el analito a medir y realzar su señal en SERS, y como se explica en el capítulo 2, que se encuentra presente en fármacos, y donde su principal identificación requerida es en agua o en entes biológicos, se da preferencia como sustrato SERS a aquellas NPs que sus LSPR se encuentren en las regiones del Cercano Infra Rojo (NIR) y que su aplicación requiera usar fuentes de excitación de 785 nm o 1064 nm de longitud de onda.

En la Figura 25 se muestra el espectro de 3 NPs de referencia. La síntesis de las 3 fue hecha siguiendo el protocolo del capítulo 3. El pico de absorción del plasmón del Cu se encontró en los 300 nm en la región del UV, el pico de absorción del plasmón de Au se encontró en los 610 nm en la región visible y finalmente la aleación Au:Cu con relación molar 1:1 presentó absorción en la región UV en los 280 nm, un plasmón recorrido al azul en la región visible en los 560 nm y en contraparte de sus homólogos de un solo metal, la bimetalicidad

en la aleación presenta una absorción en la región del cercano infrarrojo (NIR), con un pico máximo en 1480 nm.

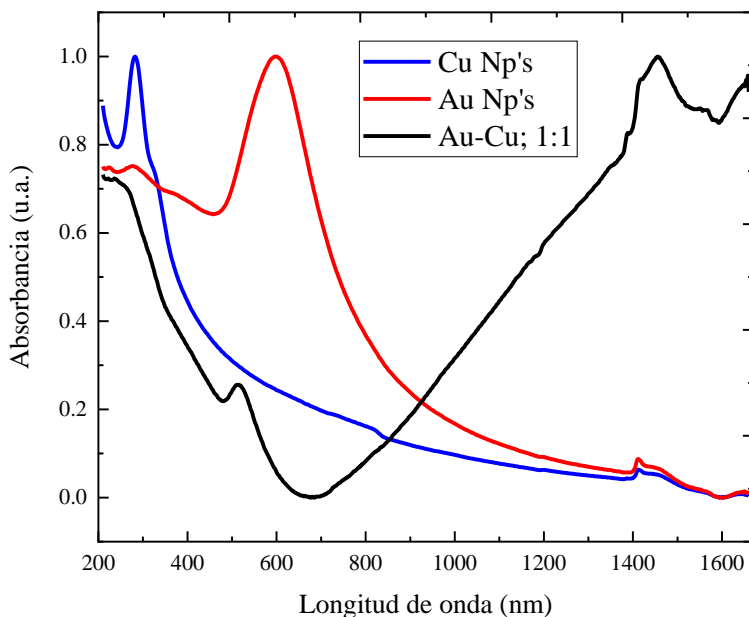


Figura 25 Espectro de absorción de 3 NPs. En azul las NPs de Cu, en rojo las de Au y en negro la aleación Au:Cu con relación molar 1:1.

En la figura 26 se muestran los 5 espectros correspondientes a las NPs sintetizadas que contienen la mayor cantidad de Au, se muestran sólo estos espectros debido al criterio usado en la sección 5.1 Potencial Z.

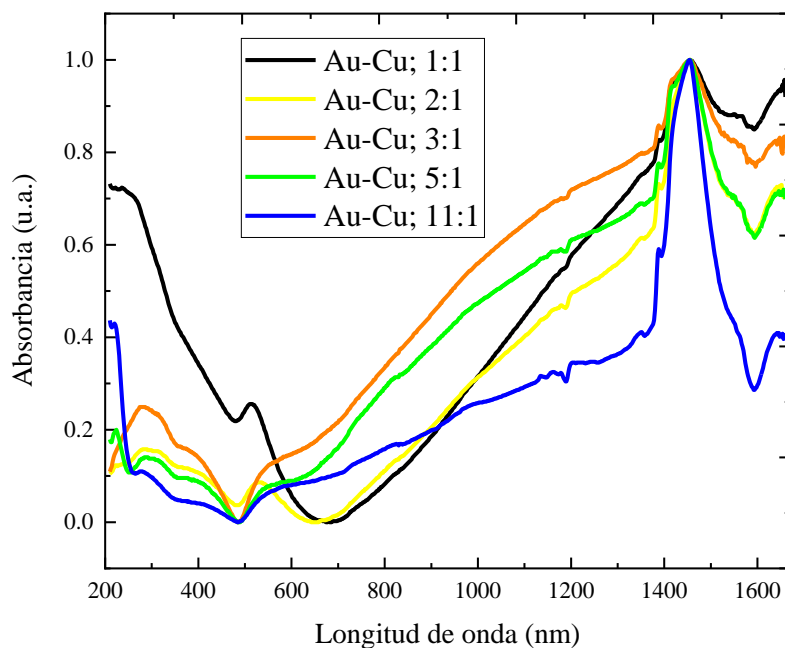


Figura 26. Espectro de absorción de las 5 NPs con mayor porcentaje de Au. En negro las NPs Au:Cu con relación molar 1:1, en amarillo las de relación molar 2:1, en naranja las de relación molar 3:1, en verde las de relación molar 5:1 y en azul las 11:1.

De la sección anterior se tienen como candidatas las síntesis de Au:Cu relación molar 1:1 y la 3:1, y un criterio fundamental a tener en cuenta es que en lugar del típico láser color verde en 532 nm que se utiliza como fuente de excitación en equipos Raman, se utiliza un láser NIR de 785 nm, esto debido a que se pretende dar aplicación a detección en zonas biológicas y recordando que son 2 las ventanas biológicas, correspondientes a los rangos espectrales de máxima penetración de la luz en los tejidos: BW-I (primera ventana biológica, **650-950 nm**) y BW-II (segunda ventana biológica, **1000-1350 nm**). Como se muestra en la figura 26, la mejor candidata es la síntesis **Au:Cu 3:1**, ya que tiene una mayor absorción en ese rango.

5.3 Microscopía electrónica de transmisión

5.3.1 NPs bimetálicas Au-Cu relación molar 1:1

La Figura 27 muestra dos micrografías de una misma síntesis correspondientes a las NPs de Au-Cu relación molar 1:1, de acuerdo a la literatura⁸⁶ durante la síntesis se forman unas semillas en forma de decaedro fruto de la aleación entre el oro y el cobre. Es debido al tipo de agente de cobertura, que en este caso es hexadecilamina, que la tendencia de crecimiento es a lo largo de las líneas (aristas del decaedro) las cuales reciben el nombre de “límites gemelos” (*twin boundaries*), en la micrografía de la figura 27 (b) se puede observar como sobre los brazos de la partícula atraviesan unas líneas, éstas son realmente una extensión del decaedro y reciben el nombre antes mencionado. Los tamaños promedio de estas nanoestrellas fueron de alrededor de 200 nm.

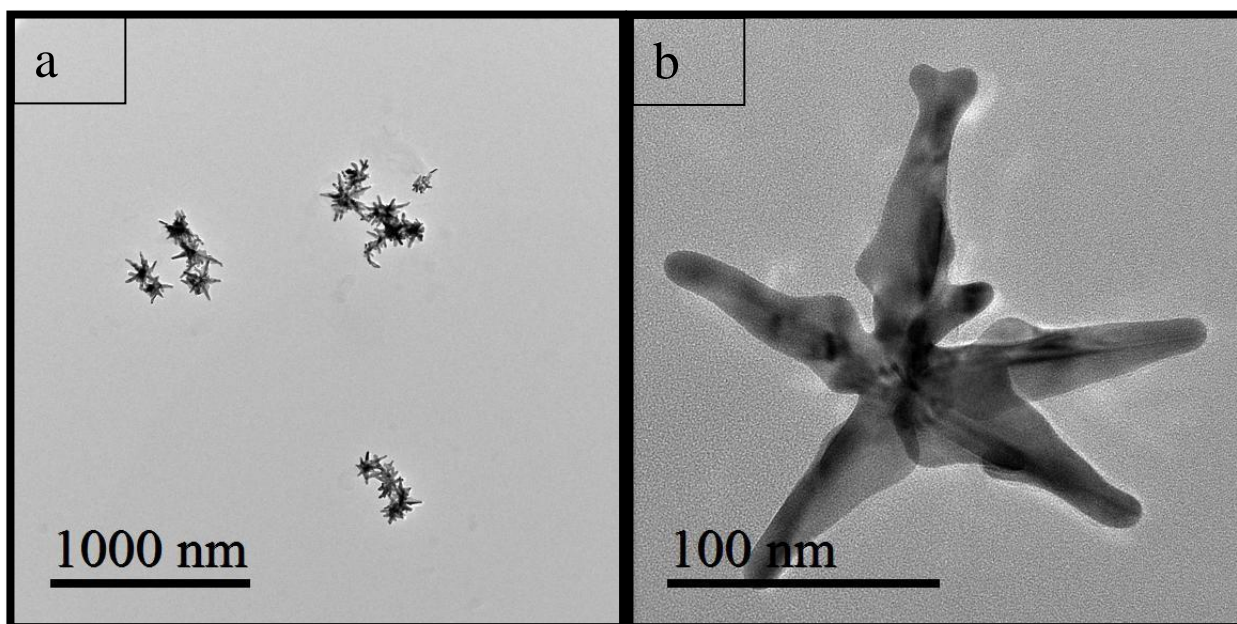


Figura 27. Micrografías TEM de nanopartículas de Au-Cu relación molar 1:1. (a) Micrografía a baja magnificación (b) Micrografía de una partícula individual representativa.

En estas micrografías se puede apreciar una diferencia importante a tomar en cuenta entre la síntesis hecha en este trabajo y la síntesis reportada en el trabajo hecho por López et. al¹¹, ya que se menciona la importancia del agente de cobertura en la preferencia del crecimiento, por ende, aunque la semilla decaédrica de Au-Cu sea la misma si el agente de cobertura es

diferente o sufre algún cambio esto se verá reflejado en las zonas de crecimiento específicas que son favorecidas, lo que conlleva a la formación de nanopartículas con morfologías diferentes. Se recuerda que para la síntesis descrita en el capítulo 4, el principal cambio en la síntesis que permitió la formación de una emulsión homogénea fue el precalentamiento a 50°C durante la sonicación del agente de cobertura, este cambio dio como resultado partículas muy similares a las hechas en la investigación de Yacamán et al.¹¹ pero con prominencias acentuadas en los brazos de la estrella, como se muestra en la figura 28.

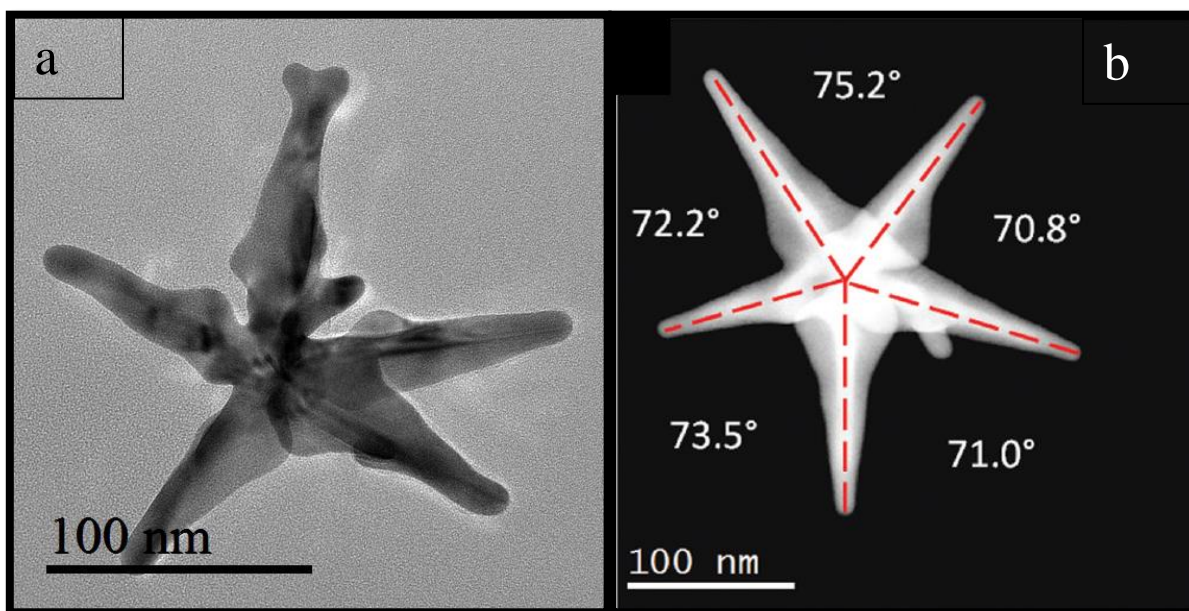


Figura 28. Micrografías TEM y HAADF-STEM respectivamente de partículas individuales Au-Cu relación molar 1:1, ambas sintetizadas por el mismo protocolo excepto por una diferencia en la preparación del agente de cobertura. (a) Nanoestrella sintetizada con el protocolo modificado de López et. al (b) Nanoestrella sintetizada por el protocolo reportado por López et. al

Como muestra la figura 28 las morfologías de las partículas son muy sensibles a cualquier cambio en los parámetros de síntesis. Las semejanzas visibles son, las mismas semillas en forma de decaedro, el crecimiento a lo largo de los “límites gemelos”, la morfología estrellada de 5 puntas; las diferencias son que los tamaños promedio cambiaron, para este trabajo estuvieron alrededor de 200 nm y para la síntesis anterior estuvieron alrededor de 300 nm, también la morfología no es exactamente la misma, para este trabajo se obtuvieron nanoestrellas con brazos con protuberancias anchas como si de un tronco le salieran pequeñas ramas.

Estas diferencias pudieron significar una mejora en las propiedades de acuerdo con los objetivos planteados, esto es debido a que las protuberancias adicionales en los brazos de las nuevas nanoestrellas sintetizadas sugieren un mayor número de “puntos calientes” (*hot spots*) los cuales pudieron significar un mayor número de zonas de distribución del campo eléctrico, lo cual sugiere la literatura es favorable como sustrato SERS.

Para continuar con la investigación, se tomaron micrografías de la partícula a alta resolución a modo de visualizar los planos cristalográficos del cristal como se muestra en la figura 29.

Como se aprecia en la figura 29 (a) por cada brazo de la nanoestrella y, acorde a como sugiere la literatura de la semilla en forma de decaedro, cada brazo tiene su propia dirección cristalográfica y de crecimiento. En la figura 29 (b) la transformada de Fourier (FFT) del cuadro rojo indica 2 planos cristalográficos presentes en la zona interna de los brazos de acuerdo con la literatura¹¹, encerrados en un círculo están los puntos correspondientes a los planos cristalográficos (111) los cuáles tienen una distancia interplanar de 0.22nm, encerrados en un triángulo están los puntos correspondientes a los planos (200) los cuáles tienen una distancia interplanar de 0.19 nm. Esto indica que dichos planos cristalográficos están expuestos en la superficie del cristal de la nanoestrella. En la figura 29 (c) la transformada inversa de Fourier (IFT) del cuadro rojo muestra un acercamiento con mayor detalle a la zona, de acuerdo con la literatura la HDA al ser un ligando débil permitió la formación de pequeñas semillas en las etapas tempranas de la reacción química, consecuentemente, la HDA por su larga cadena de carbonos retrasó el crecimiento a lo largo de la dirección [100] el cual pertenece al de la cara del decaedro, pero si favoreciendo la deposición y restructuramiento de átomos adicionales a lo largo de los límites gemelos, dicho de otra forma, la HDA favoreció el crecimiento en la dirección de las aristas de la semilla en forma de decaedro. Estas aristas o límites gemelos de la semilla se extienden en forma de brazos a lo largo del plano (111) a lo cual se aprecia su distancia interplanar de 0.22 nm en la figura 29 (c) y también se indica la distancia interplanar de 0.19 nm correspondiente al plano (200). Lo anterior sugiere que la HDA recubre y promueve preferentemente las facetas {111} y {100}⁵⁹.

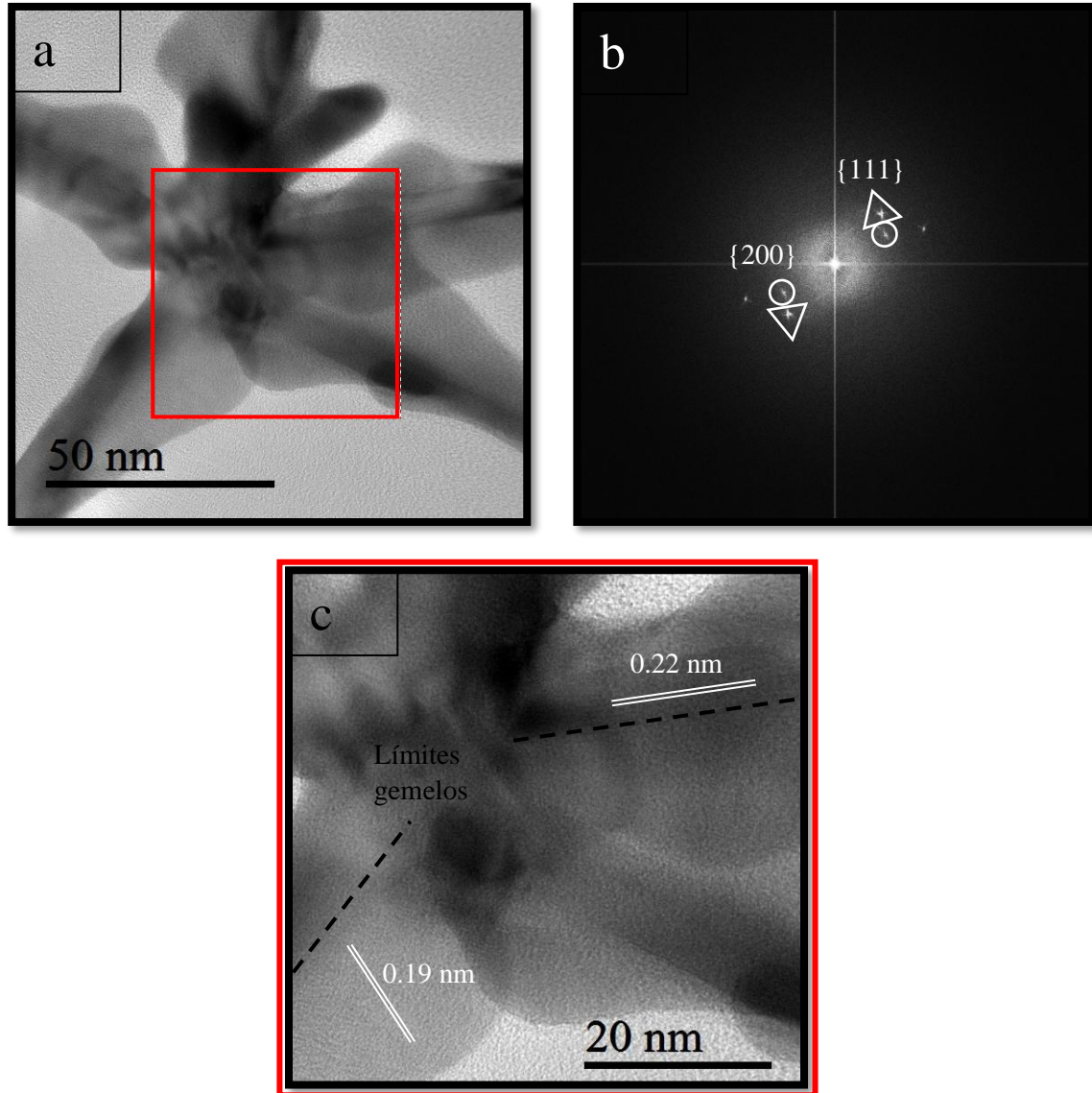


Figura 29. Análisis de las micrografías correspondientes a las nanopartículas bimetálicas relación molar Au-Cu 1:1. (a) Micrografía TEM de la zona interna de la partícula bimetalica. (b) Transformada de Fourier {FFT} de la zona roja, en este espacio recíproco cada punto espejo representa un plano cristalográfico. (c) Transformada Inversa de Fourier {IFT} acorde al cuadro rojo.

5.3.2 NPs bimetálicas Au-Cu relación molar 2:1

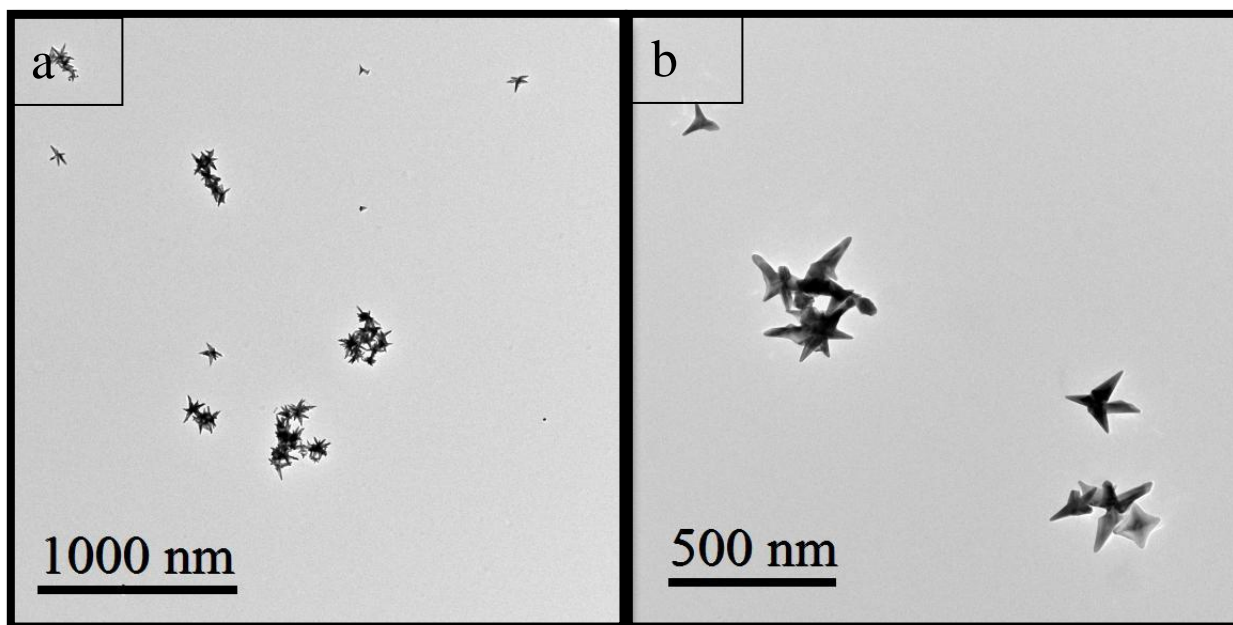


Figura 30. Micrografías TEM de nanopartículas de Au-Cu relación molar 2:1. (a) Micrografía a baja magnificación mostrando agrupaciones de partículas. (b) Micrografía a baja magnificación mostrando de manera más clara las morfologías presentes.

La figura 30 muestra 2 micrografías correspondientes a 2 magnificaciones diferentes de una misma síntesis, las NPs de Au-Cu relación molar 2:1. Ésta síntesis se siguió bajo el protocolo de la sección 4.1.5, en donde las relaciones molares de los precursores metálicos fueron de 2 a 1, siendo 200 mL de HAuCl_4 y 100 mL de CuCl_2 ambos a 1 molar. Las diferencias entre las NPs de la sección anterior radican en su proporción de metales, lo cual en cuanto a morfología respecta en el tamaño, y formas diferentes.

Se puede apreciar en la figura 30 (b) que las formas son también de estrellas con protuberancias, sin embargo, ahora no hay un patrón claro de crecimiento en los sentidos de la semilla dodecaédrica. En la figura 31 se muestra mejor el detalle de la NP.

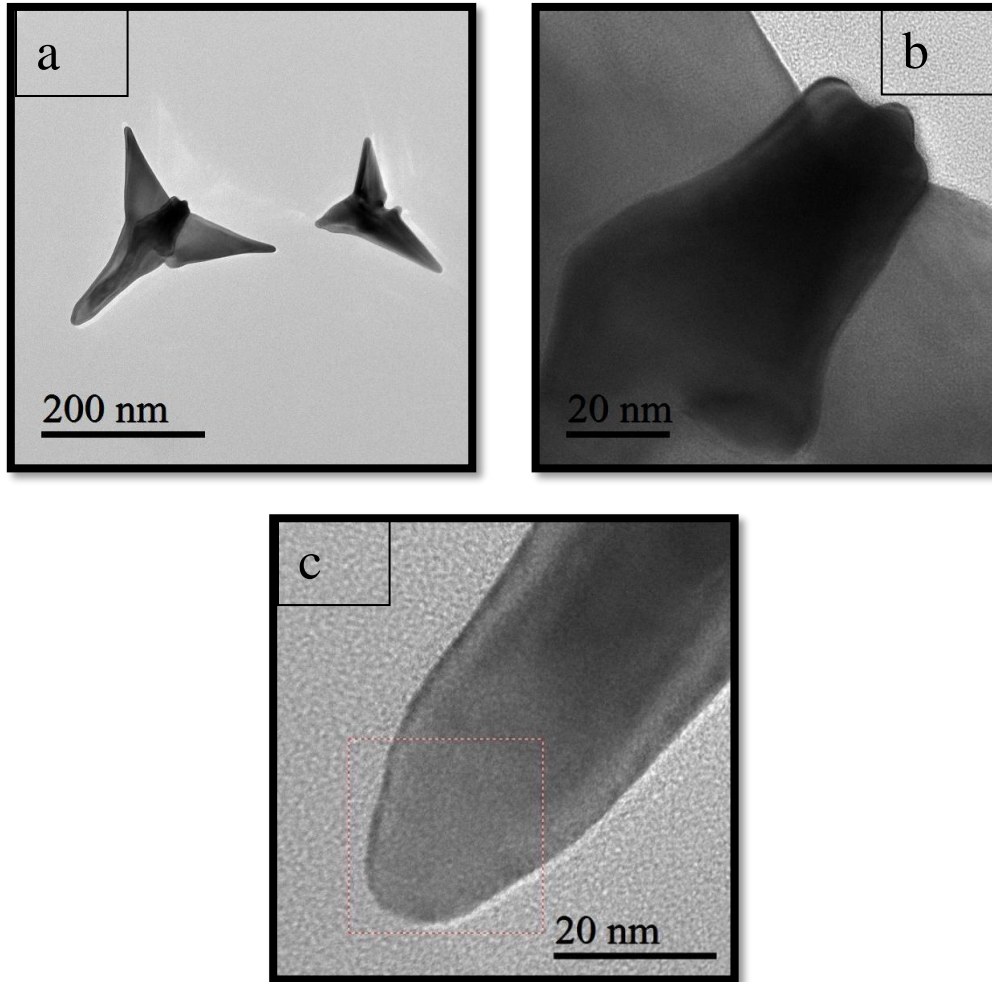


Figura 31 Micrografías TEM correspondientes a las nanopartículas bimetálicas relación molar Au-Cu 2:1. (a) Micrografía TEM a alta magnificación de 2 partículas individuales. (b) Zona interna de la partícula. (c) Punta de la partícula.

Como se puede apreciar en la figura 31 (a) las NPs tienen una morfología de poliedro de estrella de 4 puntas, con un tamaño promedio de 200 nm y una longitud de punta de 100 nm. La figura 31 (b) y (c) muestran zonas específicas de la partícula siendo una cara y la punta respectivamente.

5.3.3 NPs bimetálicas Au-Cu relación molar 3:1

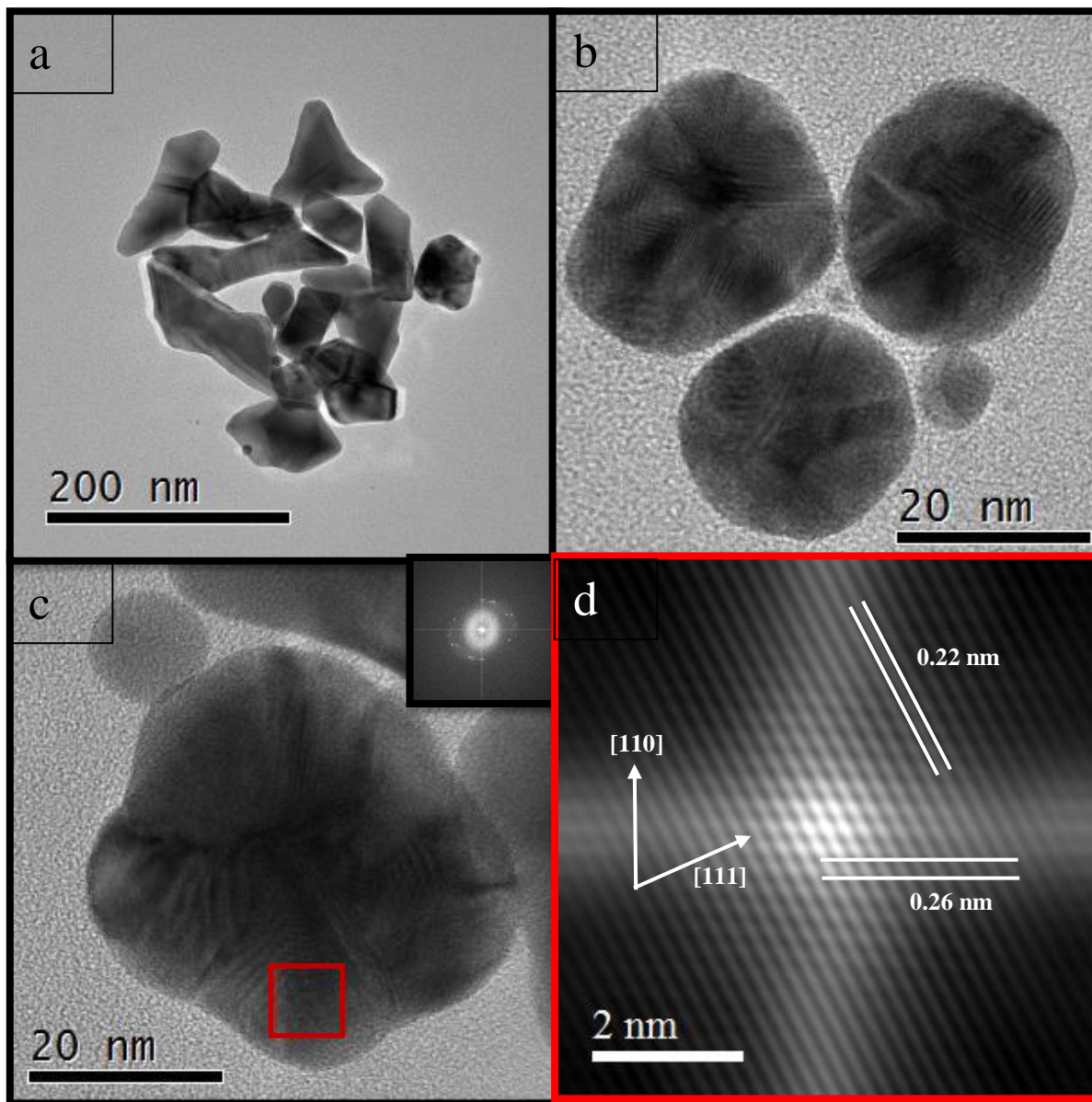


Figura 32. Análisis de las micrografías correspondientes a las nanopartículas bimetálicas relación molar Au-Cu 3:1. (a) Micrografía TEM de baja magnificación (b) Micrografía TEM de alta magnificación, de partículas individuales (c) Micrografía TEM de alta magnificación de partícula individual con una Transformada de Fourier {FFT} de la zona roja, en este espacio recíproco cada punto espejo representa un plano cristalográfico. (d) Transformada Inversa de Fourier {IFT} acorde al cuadro rojo.

De acuerdo con la figura 32 (a) se aprecian a baja magnificación una agrupación de NPs Au-Cu relación molar 3:1, donde ya se tienen formas heterogéneas con tamaños promedio de 100 nm, la figura 32 (b) se muestra una micrografía a alta magnificación de 3 partículas de

30 nm de diámetro las cuales tienen morfología de poliedro, la figura 32 (c) muestra una micrografía de una partícula individual a alta magnificación, donde en la parte superior derecha se tiene una Transformada de Fourier {FFT} de la zona roja, en este espacio recíproco cada punto espejo representa un plano cristalográfico y finalmente la figura 32 (d) muestra la Transformada Inversa de Fourier {IFT} acorde al cuadro rojo y dicha IFT le corresponden 2 planos cristalográficos acorde a la literatura¹¹. Esta síntesis es la que presentó las características mas deseables para el desarrollo de la prueba SERS.

5.3.3 NPs bimetálicas Au-Cu relación molar 5:1

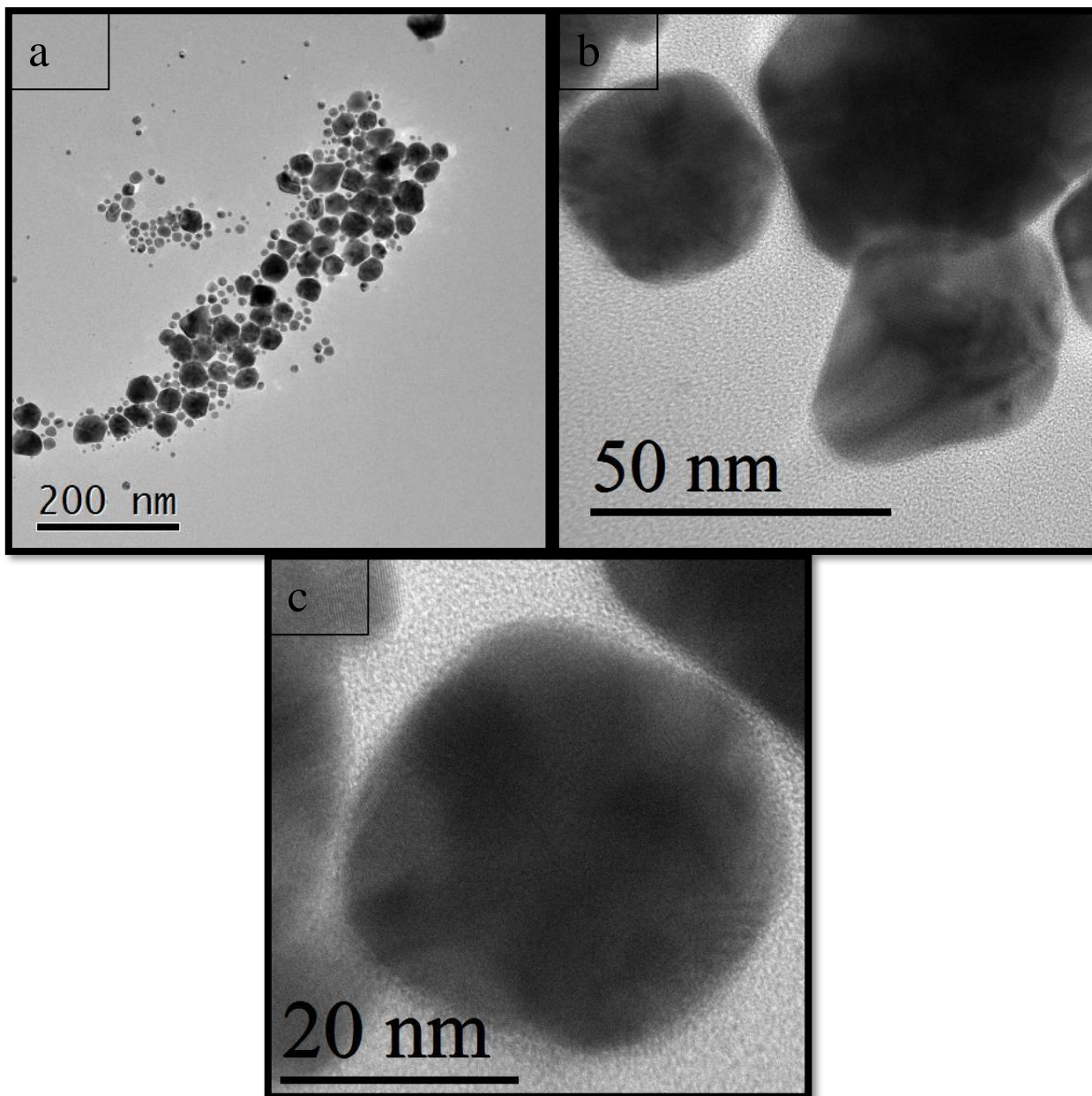


Figura 33. Micrografías TEM correspondientes a las nanopartículas bimetálicas relación molar Au-Cu 5:1. (a) Micrografía TEM a baja magnificación de un conjunto de partículas. (b) Media magnificación. (c) Alta magnificación de una partícula individual.

La figura 33 presenta 3 diferentes magnificaciones TEM correspondientes a las nanopartículas bimetálicas relación molar Au-Cu 5:1.

El tamaño promedio de las NPs es de 30 nm y se puede observar como la tendencia es que entre mayor sea la cantidad de Au en el sistema, las partículas tienden a truncar sus brazos.

5.5 SERS

Los resultados SERS fueron obtenidos como lo menciona el desarrollo experimental de la sección 4.3, los espectros fueron procesados en Matlab bajo un programa especial propiedad intelectual del Dr. Edgar Guevara Codina, en el que se les aplica una línea base, un suavizado y una deconvolución, las 6 diferentes concentraciones del IMZ en presencia del sustrato SERS (Au-Cu 3:1) se muestra de manera gráfica en la figura 34 (a).

Por otra parte, una vez obtenidos los espectros se encontraron los 13 principales modos del sistema sustrato+IMZ, y se hizo un cálculo en MatLab con los datos:

- i. Longitud de onda de excitación = 785 nm
- ii. Peso molecular del IMZ = 68.08 g/mol
- iii. Apertura del objetivo = 0.40 (una magnificación de 20x)
- iv. Densidad del IMZ = 1.23 g/cm³
- v. Área superficial del IMZ = 0.287nm²

Tomando en cuentas los datos anteriores y los modos Raman de los espectros con y sin realce, se calculó bajo el programa del Dr. Guevara el factor de realce (EF), el cual se esquematiza en un box plot en la figura 34 (b).

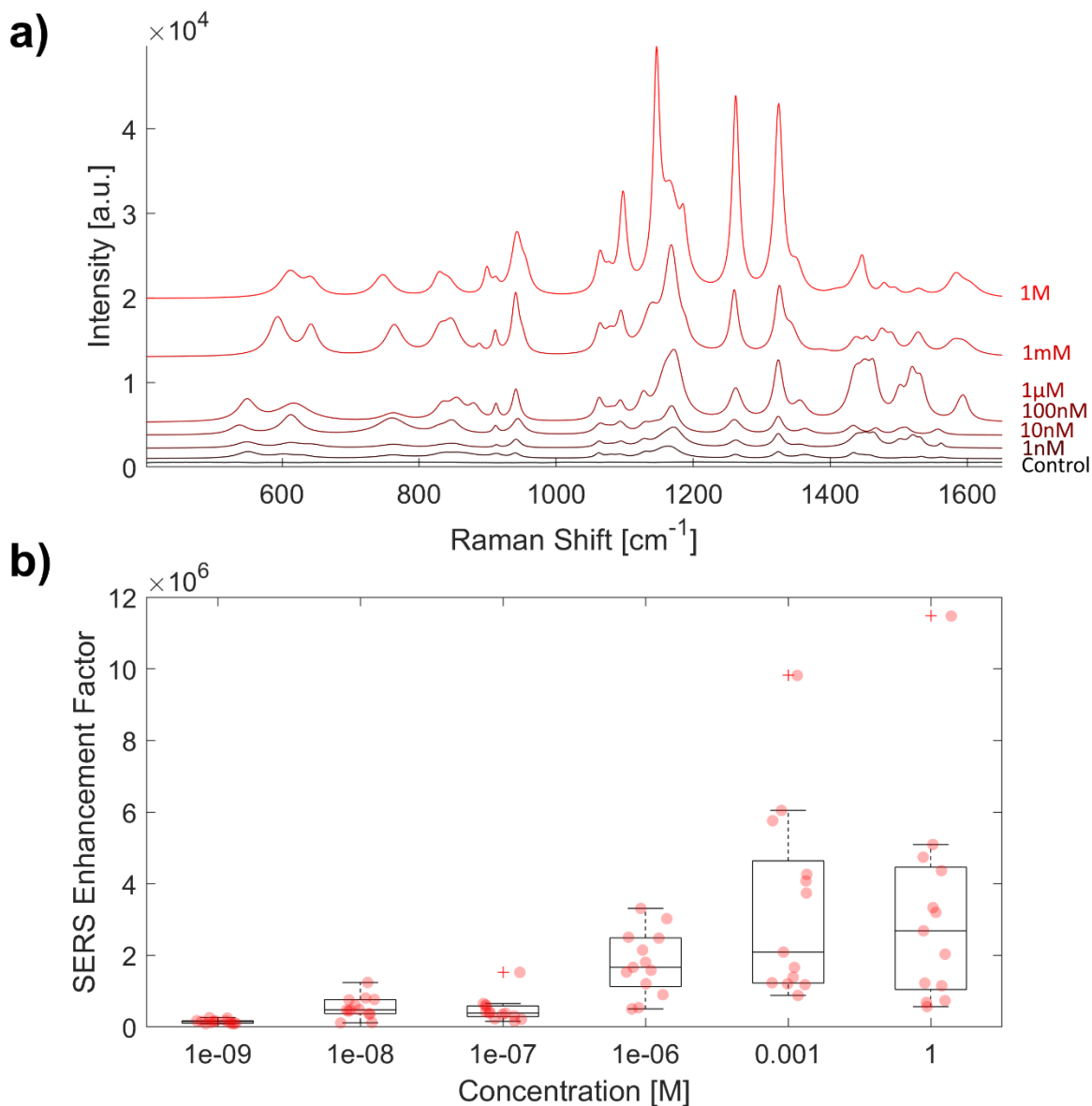


Figura 34. (a) Deconvolución de los principales modos Raman de la molécula IMZ, apilados en orden de concentración del analito, siendo una gráfica de corrimiento Raman contra intensidad. (b) Boxplot de los factores de realce puntuales por cada modo Raman

La figura 35 muestra la dependencia lineal entre los modos característicos Raman del IMZ contra el factor de realce de los mismos. Cabe mencionar que los puntos representan la media de los datos (modos), y la desviación estándar es alta debido a modos individuales que se salieron de la media, los cuales son casos excepcionales pues la mayoría de modos se comportan de acuerdo a la regresión lineal.

La R^2 o coeficiente de determinación es una medida estadística de que tan cerca están los datos de la línea de regresión, siendo $R^2 = 1$ una regresión perfecta, es entonces que el valor de $R^2 = 0.901$ se considera un valor de gran certidumbre. Es por ello que se entiende que el factor de realce se comporta de acuerdo a lo esperado matemáticamente y los datos son fiables, dando un resultado de un **EF del orden de 10^6** .

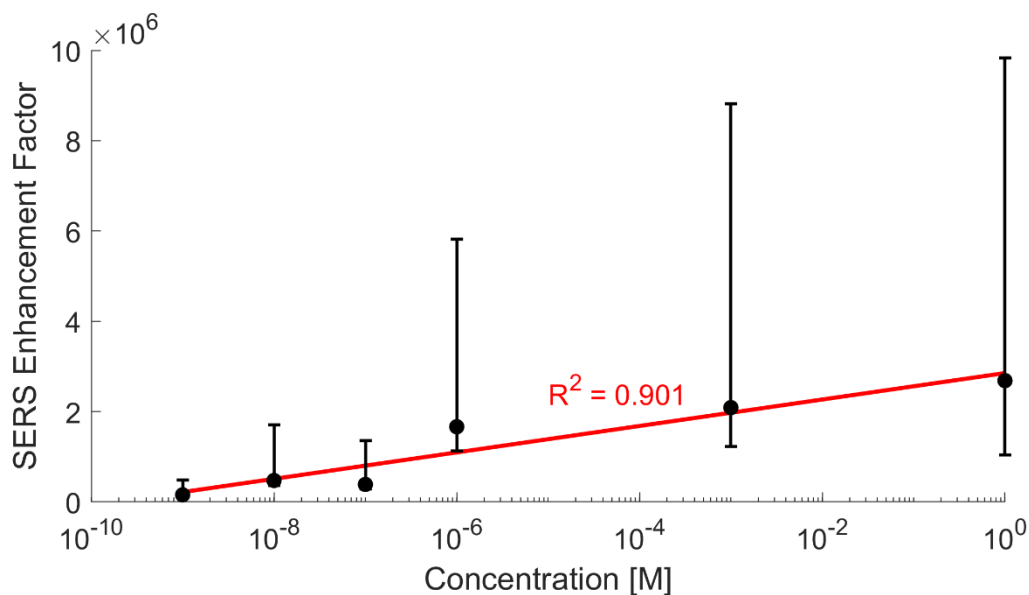


Figura 35. Regresión lineal de las medias de los EF por cada concentración de analito.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

6.1 Conclusiones

Nanopartículas bimetálicas Au-Cu fueron obtenidas mediante una síntesis química usando glucosa como agente reductor débil y hexadecilamina (HDA) como agente estabilizante.

Al calentar la emulsión de HDA + H₂O a 60°C se generan mas sitios de nucleación lo que conlleva a la formación de NP's con un mayor número de puntas (hot spots)

El cambio en la relación molar de los precursores metálicos durante la síntesis posibilita la obtención de NP's Au-Cu con diferentes propiedades ópticas y morfológicas.

Las morfologías de las NP's bimetálicas AuCu cuando son concentraciones similares forman estrellas de diferentes brazos, a medida que se incrementa la concentración de Au en las Np's bimetálicas la morfología tiende a una cuasiesfera.

El potencial Z de todas las NP's bimetálicas está dentro del rango que se considera como coloidalmente estable (mayores a 30 mV), a excepción de la NP relación 5:1 (26 mV).

Los espectros de UV-Vis de las NP's bimetálicas AuCu muestran absorción en los rangos UV, Vis y en las I-BW, II-BW, lo que indica que estas NPs bimetálicas son excelentes candidatos para aplicarse como sustratos SERS en espectroscopia Raman.

Las NP's bimetálicas Au-Cu utilizadas como sustratos SERS pueden detectar concentraciones de 10^{-9} molar de la molécula de imidazol, obteniendo un factor de realce de hasta 10^6 .

6.2 Perspectivas

Este trabajo muestra la aplicación en SERS de un analito muy específico, y de gran relevancia, el IMZ, sin embargo, se puede ampliar el estudio a moléculas orgánicas similares y de igual importancia, también en fármacos y, siguiendo la tendencia de aplicaciones en SERS se proyecta detección de partículas dañinas en aguas residuales, o biomarcadores.

Otra rama que vale la pena destacar como posible aplicación es en tratamientos fototérmicos contra el cáncer debido a su elevada absorción en las ventanas biológicas.

Finalmente, en aparatos especializados que se requiera mayor precisión en la identificación de contaminantes o compuestos activos inmersos en una solución homogénea, es posible implementar este tipo de tecnología de detección sensible y no invasiva.

BIBLIOGRAFÍA

1. Calvo F. *Nanoalloys: From Fundamentals to Emergent Applications*. Elsevier; 2020.
2. Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*. 2008;17(5):326-343.
3. Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2434-2443.
4. Panyala NR, Peña-Méndez EM, Havel J. Gold and nano-gold in medicine: overview, toxicology and perspectives. *J Appl Biomed*. 2009;7(2).
5. Kreibig U, Vollmer M. *Optical Properties of Metal Clusters*. Vol 25. Springer Science & Business Media; 2013.
6. Liu X, Dai Q, Austin L, et al. A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering. *J Am Chem Soc*. 2008;130(9):2780-2782.
7. Stewart ME, Anderton CR, Thompson LB, et al. Nanostructured plasmonic sensors. *Chem Rev*. 2008;108(2):494-521.
8. Gupta S, Huda S, Kilpatrick PK, Velev OD. Characterization and optimization of gold nanoparticle-based silver-enhanced immunoassays. *Anal Chem*. 2007;79(10):3810-3820.
9. Baptista P, Pereira E, Eaton P, et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391(3):943-950.
10. Luo PG, Stutzenberger FJ. Nanotechnology in the detection and control of microorganisms. *Adv Appl Microbiol*. 2008;63:145-181.
11. Bazán-Díaz L, Mendoza-Cruz R, Velázquez-Salazar JJ, et al. Gold-copper nanostars

- as photo-thermal agents: Synthesis and advanced electron microscopy characterization. *Nanoscale*. 2015;7(48):20734-20742. doi:10.1039/c5nr06491k
12. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci*. 2008;23(3):217-228.
 13. Lal S, Clare SE, Halas NJ. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact. *Acc Chem Res*. 2008;41(12):1842-1851.
 14. Gholipourmalekabadi M, Mobaraki M, Ghaffari M, et al. Targeted drug delivery based on gold nanoparticle derivatives. *Curr Pharm Des*. 2017;23(20):2918-2929.
 15. Tang Z, Wang Y, Podsiadlo P, Kotov NA. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. *Adv Mater*. 2006;18(24):3203-3224.
 16. Gobin AM, Lee MH, Halas NJ, James WD, Drezek RA, West JL. Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. *Nano Lett*. 2007;7(7):1929-1934.
 17. Park J, Estrada A, Sharp K, et al. Two-photon-induced photoluminescence imaging of tumors using near-infrared excited gold nanoshells. *Opt Express*. 2008;16(3):1590-1599.
 18. Zharov VP, Galanzha EI, Shashkov E V, Khlebtsov NG, Tuchin V V. In vivo photoacoustic flow cytometry for monitoring of circulating single cancer cells and contrast agents. *Opt Lett*. 2006;31(24):3623-3625.
 19. Khlebtsov NG, Dykman LA. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J Quant Spectrosc Radiat Transf*. 2010;111(1):1-35.
 20. Chen L, Hu H, Chen Y, Gao J, Li G. Plasmonic Cu_{2-x}S nanoparticles: a brief introduction of optical properties and applications. *Mater Adv*. 2021;2(3):907-926.
 21. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics*. 2007;2(3):107-118.

22. Agrawal A, Cho SH, Zandi O, Ghosh S, Johns RW, Milliron DJ. Localized surface plasmon resonance in semiconductor nanocrystals. *Chem Rev.* 2018;118(6):3121-3207.
23. Kanehara M, Koike H, Yoshinaga T, Teranishi T. Indium tin oxide nanoparticles with compositionally tunable surface plasmon resonance frequencies in the near-IR region. *J Am Chem Soc.* 2009;131(49):17736-17737.
24. Buonsanti R, Llordes A, Aloni S, Helms BA, Milliron DJ. Tunable infrared absorption and visible transparency of colloidal aluminum-doped zinc oxide nanocrystals. *Nano Lett.* 2011;11(11):4706-4710.
25. De Trizio L, Buonsanti R, Schimpf AM, et al. Nb-doped colloidal TiO₂ nanocrystals with tunable infrared absorption. *Chem Mater.* 2013;25(16):3383-3390.
26. Huang Q, Hu S, Zhuang J, Wang X. MoO_{3-x}-based hybrids with tunable localized surface plasmon resonances: chemical oxidation driving transformation from ultrathin nanosheets to nanotubes. *Chem Eur J.* 2012;18(48):15283-15287.
27. Manthiram K, Alivisatos AP. Tunable localized surface plasmon resonances in tungsten oxide nanocrystals. *J Am Chem Soc.* 2012;134(9):3995-3998.
28. Guler U, Shalaev VM, Boltasseva A. Nanoparticle plasmonics: going practical with transition metal nitrides. *Mater Today.* 2015;18(4):227-237. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mattod.2014.10.039>
29. Okamoto H, Chakrabarti DJ, Laughlin DE, Massalski TB. The Au–Cu (gold-copper) system. *J Phase Equilibria.* 1987;8(5):454-474.
30. Guisbiers G, Mejia-Rosales S, Khanal S, Ruiz-Zepeda F, Whetten RL, José-Yacamán M. Gold–copper nano-alloy, “tumbaga”, in the era of nano: phase diagram and segregation. *Nano Lett.* 2014;14(11):6718-6726.
31. Navruz N. Crystallography of cubic to orthorhombic martensitic transformation based on the infinitesimal deformation approach in the alloy AuCu. *Phase Transitions.* 2003;76(12):1029-1035.

32. Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem Phys Lett.* 1974;26(2):163-166. doi:10.1016/0009-2614(74)85388-1
33. Albrecht MG, Creighton JA. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J Am Chem Soc.* 1977;99(15):5215-5217.
34. Lin Z, He L. Recent advance in SERS techniques for food safety and quality analysis: a brief review. *Curr Opin Food Sci.* 2019;28:82-87.
35. Le Ru E, Etchegoin P. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: And Related Plasmonic Effects.* Elsevier; 2008.
36. Siebert F, Hildebrandt P. *Vibrational Spectroscopy in Life Science.* John Wiley & Sons; 2008.
37. Khan M, Do Nascimento GM, El-Azazy M. *Modern Spectroscopic Techniques and Applications.* BoD–Books on Demand; 2020.
38. Brundle CR, Evans CA, Wilson SBT-E of MC, eds. INTRODUCTION TO VIBRATIONAL SPECTROSCOPIES AND NMR. In: Butterworth-Heinemann; 1992:413-415. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-08-052360-6.50040-0
39. Amendola V, Pilot R, Frascioni M, Maragò OM, Iatì MA. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *J Phys Condens Matter.* 2017;29(20):203002. doi:10.1088/1361-648x/aa60f3
40. Li Z, Young RJ, Kinloch IA, Wilson NR, Marsden AJ, Raju APA. Quantitative determination of the spatial orientation of graphene by polarized Raman spectroscopy. *Carbon N Y.* 2015;88:215-224.
41. Peng X, Yuan B, Feng Y. Grafting of silica with a hydrophilic triol acrylamide polymer via surface-initiated “grafting from” method for hydrophilic-interaction chromatography. *J Sep Sci.* 2011;34(22):3123-3130.
42. Fazio B, D’Andrea C, Villari V, et al. Surface enhanced Raman spectroscopy of biomolecules in buffer solution. *AAPP Atti della Accad Peloritana dei Pericolanti, Cl*

di Sci Fis Mat e Nat. 2011;89. doi:10.1478/C1V89S1P035

43. Mosier-Boss PA. Review of SERS substrates for chemical sensing. *Nanomaterials.* 2017;7(6). doi:10.3390/nano7060142
44. Pines D. Collective energy losses in solids. *Rev Mod Phys.* 1956;28(3):184.
45. Kreibig U, Vollmer M. Theoretical considerations. In: *Optical Properties of Metal Clusters.* Springer; 1995:13-201.
46. Haes AJ, Haynes CL, McFarland AD, Schatz GC, Van Duyne RP, Zou S. Plasmonic materials for surface-enhanced sensing and spectroscopy. *MRS Bull.* 2005;30(5):368-375.
47. Israelsen ND, Hanson C, Vargis E. Nanoparticle properties and synthesis effects on surface-enhanced Raman scattering enhancement factor: an introduction. *Sci World J.* 2015;2015.
48. Tian F, Bonnier F, Casey A, Shanahan AE, Byrne HJ. Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape. *Anal Methods.* 2014;6(22):9116-9123.
49. Andreou C, Hoonejani MR, Barmi MR, Moskovits M, Meinhart CD. Rapid detection of drugs of abuse in saliva using surface enhanced Raman spectroscopy and microfluidics. *ACS Nano.* 2013;7(8):7157-7164.
50. Latif-Ur-Rahman, Shah A, Qureshi R, et al. Spectroscopic analysis of Au-Cu alloy nanoparticles of various compositions synthesized by a chemical reduction method. *Adv Mater Sci Eng.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/638629
51. Ball P. Martin Fleischmann (1927–2012). *Nature.* 2012;489(7414):34. doi:10.1038/489034a
52. Sardar R, Funston AM, Mulvaney P, Murray RW. Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir.* 2009;25(24):13840-13851. doi:10.1021/la9019475
53. Clavero C. Plasmon-induced hot-electron generation at nanoparticle/metal-oxide interfaces for photovoltaic and photocatalytic devices. *Nat Photonics.* 2014;8(2):95-

103.

54. Markin A V, Markina NE, Popp J, Cialla-May D. Copper nanostructures for chemical analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy. *TrAC Trends Anal Chem.* 2018;108:247-259.
55. Kudelski A, Bukowska J, Janik-Czachor M, Grochala W, Szummer A, Dolata M. Characterization of the copper surface optimized for use as a substrate for surface-enhanced Raman scattering. *Vib Spectrosc.* 1998;16(1):21-29.
56. Kowalska AA, Kaminska A, Adamkiewicz W, Witkowska E, Tkacz M. Novel highly sensitive Cu-based SERS platforms for biosensing applications. *J Raman Spectrosc.* 2015;46(5):428-433.
57. Chen H, Shao L, Li Q, Wang J. Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chem Soc Rev.* 2013;42(7):2679-2724.
58. Wu J, Zang J, Rathmell AR, Zhao X, Wiley BJ. Reversible sliding in networks of nanowires. *Nano Lett.* 2013;13(6):2381-2386.
59. Jin M, He G, Zhang H, Zeng J, Xie Z, Xia Y. Shape-controlled synthesis of copper nanocrystals in an aqueous solution with glucose as a reducing agent and hexadecylamine as a capping agent. *Angew Chemie Int Ed.* 2011;50(45):10560-10564.
60. Pastoriza-Santos I, Sánchez-Iglesias A, Rodríguez-González B, Liz-Marzán LM. Aerobic synthesis of Cu nanoplates with intense plasmon resonances. *Small.* 2009;5(4):440-443.
61. He R, Wang YC, Wang X, et al. Facile synthesis of pentacle gold-copper alloy nanocrystals and their plasmonic and catalytic properties. *Nat Commun.* 2014;5. doi:10.1038/ncomms5327
62. Kuang Q, Wang X, Jiang Z, Xie Z, Zheng L. High-energy-surface engineered metal oxide micro-and nanocrystallites and their applications. *Acc Chem Res.* 2014;47(2):308-318.
63. Colombo L, Bleckmann P, Schrader B, Schneider R, Plessner T. Calculation of normal

- vibrations and intra- and intermolecular force constants in crystalline imidazole. *J Chem Phys.* 1974;61(8):3270-3278. doi:10.1063/1.1682487
64. Colombo L, Bleckmann P, Schrader B, Schneider R, Plessner T. Calculation of normal vibrations and intra- and intermolecular force constants in crystalline imidazole. *J Chem Phys.* 1974;61(8):3270-3278.
65. Suvarna AS. Imidazole and its derivatives and importance in the synthesis of pharmaceuticals: a review. *Res J Chem Sci* _____ *ISSN.* 2015;2231:606X.
66. Narasimhan B, Sharma D, Kumar P. Biological importance of imidazole nucleus in the new millennium. *Med Chem Res.* 2011;20(8):1119-1140.
67. Takeuchi H. Raman structural markers of tryptophan and histidine side chains in proteins. *Biopolym Orig Res Biomol.* 2003;72(5):305-317.
68. Prada WAR. FENÓMENOS TAUTOMÉRICOS EN SISTEMAS HETEROCÍCLICOS AROMÁTICOS. Published online 2015.
69. Torreggiani A, Fini G, Bottura G. Effect of transition metal binding on the tautomeric equilibrium of the carnosine imidazolic ring. *J Mol Struct.* 2001;565:341-346.
70. Matulaitienė I, Kuodis Z, Eicher-Lorka O, Niaura G. SERS characterization of imidazole ring terminated self-assembled monolayer formed from lipoic acid histamide on silver electrode. *J Electroanal Chem.* 2013;700:77-85.
71. Kudelski A. Raman spectroscopy of surfaces. *Surf Sci.* 2009;603(10-12):1328-1334.
72. Collado JA, Tunon I, Silla E, Ramírez FJ. Vibrational dynamics of histamine monocation in solution: an experimental (FT-IR, FT-Raman) and theoretical (SCRF-DFT) study. *J Phys Chem A.* 2000;104(10):2120-2131.
73. Pottathara YB, Thomas S, Kalarikkal N, Grohens Y, Kokol V. *Nanomaterials Synthesis: Design, Fabrication and Applications.* Elsevier; 2019.
74. Hu J, Zhu X, Li H, et al. Theranostic Au cubic nano-aggregates as potential

- photoacoustic contrast and photothermal therapeutic agents. *Theranostics*. 2014;4(5):534.
75. Thota S, Wang Y, Zhao J. Colloidal Au–Cu alloy nanoparticles: synthesis, optical properties and applications. *Mater Chem Front*. 2018;2(6):1074-1089.
76. Wang H, Tam F, Grady NK, Halas NJ. Cu Nanoshells: Effects of Interband Transitions on the Nanoparticle Plasmon Resonance. *J Phys Chem B*. 2005;109(39):18218-18222. doi:10.1021/jp053863t
77. Dukhin AS, Goetz PJ. Fundamentals of interface and colloid science. In: *Studies in Interface Science*. Vol 24. Elsevier; 2010:21-89.
78. Cosgrove T. *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*. John Wiley & Sons; 2010.
79. Garrido Garrido E. Estudios de potencial zeta sobre la sulfuración de un mineral de malaquita y su aplicación en la flotación. Published online 2015. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/301888>
80. Conway BE, Bockris J, Ammar IA. The dielectric constant of the solution in the diffuse and Helmholtz double layers at a charged interface in aqueous solution. *Trans Faraday Soc*. 1951;47:756-766.
81. Rojas N. Modelación de la Ecuación Constitutiva de Suspensiones de Caolín en Función de la Energía Libre Superficial del Mineral. Published online January 1, 2013. doi:10.13140/RG.2.2.16778.93122
82. Crocker JC, Grier DG. Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid. *Phys Rev Lett*. 1994;73(2):352.
83. Hunter RJ. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Vol 2. Academic press; 2013.
84. HORIBA France SAS. UV Raman Spectrometer for UV Raman spectroscopists. <https://www.horiba.com/int/scientific/products/detail/action/show/Product/uv-raman-spectrometer-1632/>

85. Ali EMA, Edwards HGM, Cox R. Forensic and security applications of a long-wavelength dispersive Raman system. *J Raman Spectrosc.* 2015;46(3):322-326.
86. Lin Y, He R, Sun L, Yang Y, Li W, Sun F. Pentacle gold–copper alloy nanocrystals: a new system for entering male germ cells in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2016;6(1):1-8.