



**CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN OPTICA, A.C.**

**“ESTUDIO DE SUBSTRATOS
PLASMÓNICOS EN AUSENCIA Y
PRESENCIA DE GRAFENO OXIDADO
(GO) PARA ESPECTROSCOPIA SERS”**

*“Versión Definitiva. Incluye cambios sugeridos por
revisores”*



Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Óptica)

Presenta: Omar Eduardo Melo Cruz

Eden Morales

Director de Tesis: Dr. Eden Morales Narváez

León · Guanajuato · México

Noviembre de 2020

A mis padres, Mercedes y Omar

“Lo que se registra como resultado de un experimento u observación nunca es el hecho escueto percibido, sino este hecho interpretado con ayuda de una cierta proporción de teoría”

El análisis de la materia. Bertrand Russell

Lista de abreviaciones

UV-Vis: Ultra Violeta-Visible	SPP: Polaritones de plasmónes de superficie
IR: Infrarrojo	LSP: Plasmónes de superficie localizados
SERS: Espectroscopia Raman mejorada por superficie	HOMO: Orbital molecular más alto ocupado
EM: Mejoramiento electromagnético	LUMO: Orbital molecular más bajo vacío
TC: Transferencia de carga	EF: Nivel de Fermi
GO: Grafeno oxidado	GERS: Mejoramiento del esparcimiento Raman por grafeno
rGO: Grafeno oxidado reducido	SEM: Microscopia electrónica de barrido
NPs: Nanopartículas	EDS: Espectroscopia de dispersión de rayos X
BC: Nanocelulosa bacteriana	AFM: Microscopia de fuerza atómica
LSPR: Resonancia de plasmónes de superficie localizados	FITC: Isotiosianato de Fluoresceína
AEF: Factor de mejoramiento analítico	
PEF: Promedio del factor de mejoramiento	
LOD: Límite de detección	
R6G: Rodamina 6G	
CV: Cristal violeta	
MG: Malaquita verde	
4-MBA: Ácido 4-mercaptobenzoico	
(2,4-DNT): 2-4 dinitrotolueno	
CFU: Unidades formadoras de colonias	
PAA: Clorhidrato de polialilamina	
PDDA: Cloruro de dialildimetilamonio	
NRS: Nanobarillas	
\hbar: constante de Planck	
K_B: constante de Boltzman	
SPs: Plasmónes de superficie	

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero que todo a mi familia, por acompañarme desde la distancia en este camino, por darme alientos en los momentos difíciles. También quiero agradecer a mis compañeros de maestría por brindarme su Amistad y compañía, por las largas horas de conversación aprendiendo sobre la cultura Mexicana. A mis compatriotas y colegas que hacen parte del CIO porque me hicieron sentir en algunos momentos como si estuviera en casa. A nuestro equipo de fútbol “CUSUMBOS” y a las retas y campeonatos de fútbol del CIO porque me permitieron realizar actividades diferentes a las académicas con las cuales pude liberar estrés. A las secretarias de la dirección de formación académica por su excelente trabajo. A mis compañeros y colegas del grupo de investigación por enseñarme a manejar algunos equipos y compartir sus conocimientos conmigo. Al Doctor Eden Morales por su asesoría y respeto además de su sencillez, lo que lo hace un gran maestro. A mis sinodales, el Doctor Pablo Cardoso y la Doctora Erika Rodríguez, por el tiempo que dedicaron a corregir esta tesis y por guiarme en el camino de la investigación.

Quiero agradecer de manera muy especial al centro de investigaciones en óptica por permitirme realizar mi especialización en sus instalaciones y a todo el grupo de investigadores y profesores que me guiaron en la formación. Finalmente quiero agradecer a CONACYT por la beca de maestría la cual fue de vital importancia para mi estadía en este México lindo y querido.

Tabla de Contenido

Lista de Figuras.....	9
Lista de Tablas	13
Resumen.....	14
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos	16
Introducción	18
Antecedentes	24
Capítulo 1. Fundamentos Teóricos	31
1.1. La espectroscopia Raman	31
1.2. Espectroscopia Raman mejorada por superficie (SERS)	37
1.3. Explicación de la intensificación en SERS por efectos electromagnéticos y de adsorción.....	38
1.3.1. Mejoramiento por efectos electromagnéticos	39
1.3.2. El efecto de la adsorción molecular.	50
1.4. Substratos plasmónicos para espectroscopia SERS	55
1.5. Nanocelulosa bacteriana como plataforma SERS	56
1.6. Grafeno y su relación con SERS.....	57
1.7. Caracterización de un sustrato SERS	62
1.7.1. Determinación de las características geométricas de las nanopartículas.	62

1.7.2. Espectro de extinción, una forma de encontrar la longitud de onda de resonancia plasmónica.	63
Capítulo 2. Desarrollo experimental	65
2.1. Materiales	65
2.2. Instrumentación.....	66
2.3. Métodos.....	69
Capítulo 3. Análisis de Resultados.....	74
3.1. Espectroscopia UV-Vis, EDS y microscopía SEM.	74
3.2. Análisis SERS	88
Capítulo 4. Conclusiones.....	103
Referencias.....	105

Lista de Figuras

- Figura 1. *Espectro Raman del FITC a una concentración de $10^{-7}M$ sobre un substrato basado en nanopapel de celulosa con nanopartículas de Ag, excitado a una longitud de onda $\lambda=785nm$. Se observan picos de la cinta adhesiva con la que se sujetó el substrato, además de efectos de fluorescencia, lo cual impide observar claramente el espectro del FITC.* 24
- Figura 2. *Diagrama de niveles de energía de los procesos anti-Stokes, donde la energía del fotón esparcido es mayor a la del fotón incidente, Rayleigh, en el cual la energía del fotón esparcido es igual a la del fotón incidente, y Stokes, en el cual la energía del fotón esparcido es menor a la del fotón incidente.*..... 32
- Figura 3. *Esquema de un espectro Raman del FITC, donde se puede observar la simetría de las bandas Stokes y anti-Stokes con respecto a la línea Rayleigh del láser.* 34
- Figura 4. *Diagrama que describe los aportes de cada mejoramiento en presencia de una nanoestructura metálica. El momento dipolar inducido en la molécula depende de la polarizabilidad α y del campo incidente E_0 , la alteración de estas dos variables son producidas por el mejoramiento electromagnético (EM) y de transferencia de carga (TC).*..... 39
- Figura 5. *Representación esquemática de (A) plasmónes polaritones de superficie (SPP) propagándose en la interface metal-dieléctrico y (B) resonancia de plasmónes de superficie localizados (LSPR) en nanopartículas metálicas.*..... 45
- Figura 6. *Esquema que describe (A) El esparcimiento Raman en ausencia de nanopartículas metálicas y (B) El esparcimiento SERS mejorado por nanopartículas metálicas.* 47
- Figura 7. *Representación esquemática del mejoramiento de transferencia de carga a través del HOMO-LUMO. (Caso (a)) La energía del láser puede entrar en resonancia con una transición electrónica del complejo metal-molécula. (Caso (b) + (c)) puede producirse una mejora gracias a un acoplamiento indirecto (transferencia de carga) a través del metal.* 54
- Figura 8. *Nanocelulosa Bacteriana. (A) Sobre una lámina de aluminio. (B) Cortada en tiras para la elaboración de substratos SERS. (C) En el proceso de preparación in situ de nanopartículas de (Ag), (Au) y (GO). (D) En el proceso de secado de los substratos SERS.*..... 57
- Figura 9. *Estructura del grafito dependiente de los enlaces y orbitales σ y π .* 58
- Figura 10. *Hibridaciones sp^2 y sp^3 del carbono desde la teoría de orbitales moleculares. Partimos de la configuración electrónica del carbono, el cual al unirse a otros elementos por enlaces covalentes, produce una promoción de un electrón del orbital s al orbital p , la mezcla de orbitales moleculares se conoce como hibridación.* 59
- Figura 11. *Esquemización del Grafito y sus derivados. (A) Grafito: el cual consta de una acumulación de capas de grafeno. (B) Grafeno: Red hexagonal de átomos de carbono con bordes de enlaces π deslocalizados. (C) Grafeno Oxidado (GO): el cual contiene abundantes grupos funcionales oxigenados. (D) Grafeno Oxidado reducido (rGO): el cual contiene menos grupos funcionales que el (GO).* 60

Figura 12. (A) Fotografía de las herramientas de perforación y de los substratos preparados para analizar su espectro de extinción. (B) Fotografía del equipo Cytation 5.	66
Figura 13. Esquema del microscopio electrónico de barrido (SEM).	67
Figura 14. (A) Fotografía del espectrómetro Renishaw. (B) Fotografía de un sustrato SERS llevado al microscopio.	68
Figura 15. Componentes de un espectrómetro Raman. 1) Fuente de luz monocromática (láser). El espectrómetro está equipado con dos láseres, un láser diodo centrado en 785 nm y otro láser de argón con líneas de excitación 514 nm y 457 nm. 2) Sistema de iluminación de la muestra que recolecta la luz esparcida (microscopio). 3) Medio para filtrar toda la luz excepto la que experimenta esparcimiento Raman (Filtros holográficos Notch o filtros dieléctricos). 4) Rejilla de difracción para dividir la luz esparcida en diferentes longitudes de onda. 5) Fotodetector para medir la luz esparcida (cámara CCD).	68
Figura 16. Esquema que describe el proceso de preparación de los substratos SERS fabricados en el laboratorio. (A) Substratos que contienen (NPs) metálicas. (B) Substratos a los que primero se agregaron (NPs) metálicas y luego (GO). (C) Substratos a los que primero se agregó (GO) y luego (NPs) metálicas.	69
Figura 17. Espectros de extinción UV-Vis de los substratos S1 (BC/AuNPs/AgNPs).	75
Figura 18. Espectros de extinción UV-Vis de los substratos S2 (BC/AuNPs/AgNPs/GO).	75
Figura 19. Espectros de extinción UV-Vis de los substratos S3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs).	76
Figura 20. Espectros de extinción UV-Vis de los substratos S4 (BC/AgNPs), S5 (BC/GO/AgNPs) y S6 (BC/Si/AgNPs).	77
Figura 21. Imágenes SEM de la nanocelulosa bacteriana (BC), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.0 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.	78
Figura 22. Espectro EDS de la nanocelulosa bacteriana (BC).	78
Figura 23. Imágenes SEM del sustrato S1-2 (BC/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.1 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.	79
Figura 24. (A) Espectro de extinción del sustrato S1-2 (BC/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S1-2 en el cual se observa una relación de 2 a 1 entre la plata y el oro.	79
Figura 25. Imágenes SEM del sustrato S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.1 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.	80
Figura 26. (A) Espectro de extinción del sustrato S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S1-5 en el cual se observa poca presencia de oro y un alto porcentaje en plata. .	80
Figura 27. Imágenes SEM del sustrato S1-6 (BC/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.1 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.	81

Figura 28. (A) Espectro de extinción del sustrato S1-6 (BC/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S1-6 en el cual se observa una relación de 2 a 1 aproximadamente entre la plata y el oro.	81
Figura 29. Imágenes SEM del sustrato S3-1 (BC/GO/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 2.9 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.	82
Figura 30. (A) Espectro de extinción del sustrato S3-1 (BC/GO/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S3-1 en el cual se observa una relación de 3 a 1 entre la plata y el oro.	82
Figura 31. Imágenes SEM del sustrato S3-3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 2.9 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.	83
Figura 32. (A) Espectro de extinción del sustrato S3-3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S3-3 en el cual se observa una relación de 3 a 1 entre la plata y el oro.	83
Figura 33. Imágenes SEM del sustrato S3-4 (BC/GO/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.0 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.	84
Figura 34. (A) Espectro de extinción del sustrato S3-4 (BC/GO/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S3-4 en el cual se observa una relación de porcentaje en peso de 3 a 1 entre la plata y el oro.	84
Figura 35. Imágenes SEM del sustrato S5 (BC/GO/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 2.9 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.	85
Figura 36. (A) Espectro de extinción del sustrato S5 (BC/GO/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S5 en el cual se observa la presencia de plata.	85
Figura 37. Imágenes SEM del sustrato S6 (BC/Si/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.1 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.	86
Figura 38. (A) Espectro de extinción del sustrato S6 (BC/Si/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S6 en el cual se observa la presencia de plata y un bajo porcentaje de silicio.	86
Figura 39. Distribución de tamaños de los sustratos fabricados. Los diagramas de caja muestran la mediana, el signo (+) el promedio, los percentiles 25% y 75% y los valores extremos de las distribuciones de tamaño. Debajo de cada sustrato aparece un diagrama que lo esquematiza.	87
Figura 40. (A) Esquematización de la molécula FITC. (B) Espectro de absorción UV-Vis del FITC.	89
Figura 41. Espectro Raman original del FITC sobre papel aluminio a una concentración de 10^{-3} M, con longitudes de onda de excitación $\lambda = 457\text{nm}$, $\lambda = 514\text{nm}$ y $\lambda = 785\text{nm}$	90
Figura 42. Espectro Raman del FITC de los sustratos en ausencia de (GO), S6 (BC/Si/AgNPs),	

<i>SI-2 (BC/AuNPs/AgNPs), SI-6 (BC/AuNPs/AgNPs) y SI-5 (BC/AuNPs/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=457$ nm.</i>	92
<i>Figura 43. Espectro Raman del FITC de los substratos en ausencia de (GO), S6 (BC/Si/AgNPs), SI-2 (BC/AuNPs/AgNPs), SI-6 (BC/AuNPs/AgNPs) y SI-5 (BC/AuNPs/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=514$ nm.</i>	94
<i>Figura 44. Espectro Raman del FITC de los substratos en ausencia de (GO), S6 (BC/Si/AgNPs), SI-2 (BC/AuNPs/AgNPs), SI-6 (BC/AuNPs/AgNPs) y SI-5 (BC/AuNPs/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=785$ nm.</i>	96
<i>Figura 45. Espectro Raman del FITC de los substratos en presencia de (GO), S3-3 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S5 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S3-1 (BC/GO/AuNps/AgNPs) y S3-4 (BC/GO/AuNps/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=457$ nm.</i>	98
<i>Figura 46. Espectro Raman del FITC de los substratos en presencia de (GO), S3-3 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S5 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S3-1 (BC/GO/AuNps/AgNPs) y S3-4 (BC/GO/AuNps/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=514$ nm.</i>	100
<i>Figura 47. Espectro Raman del FITC de los substratos en presencia de (GO), S3-3 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S5 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S3-1 (BC/GO/AuNps/AgNPs) y S3-4 (BC/GO/AuNps/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=785$ nm.</i>	102

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Parámetros asociados a la sensibilidad de los substratos SERS que contienen nanopartículas metálicas, (GO) y (rGO).</i>	29
Tabla 2. <i>Parámetros controlables en la elaboración de substratos SERS que contienen nanopartículas metálicas, (GO) y (rGO).</i>	30
Tabla 3. <i>Diferencias a considerar entre el mejoramiento electromagnético (EM) y el mejoramiento de transferencia de carga (TC).</i>	55
Tabla 4. <i>Condiciones de los reactivos utilizados para la elaboración de los substratos plasmónicos.</i>	73
Tabla 5. <i>Datos de la caracterización óptica y química de los substratos elaborados.</i>	88
Tabla 6. <i>Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 41.</i>	91
Tabla 7. <i>Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 42.</i>	93
Tabla 8. <i>Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 43.</i>	95
Tabla 9. <i>Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 44.</i>	97
Tabla 10. <i>Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 45.</i>	99
Tabla 11. <i>Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 46.</i>	101

Resumen

La detección y análisis molecular son de gran interés en la comunidad científica, tecnológica e industrial. Algunas técnicas de espectroscopia como son la espectroscopia IR y la espectroscopia Raman, proporcionan información sobre un gran número de moléculas. Cuando la radiación electromagnética (luz) interactúa con un grupo de moléculas, experimenta un fenómeno conocido como esparcimiento, el cual es provocado por pequeños cambios en los movimientos vibratorios de las moléculas. El análisis de la luz esparcida nos permite obtener la huella dactilar de las moléculas. Sin embargo, en algunas moléculas el efecto de esparcimiento de la luz resulta ser muy débil, impidiendo que se pueda obtener su huella dactilar. Los substratos SERS se presentan como alternativa para obtener un mejor registro de las señales Raman de las moléculas. Dichos substratos contienen nanopartículas metálicas, que al interactuar con la luz en condiciones de resonancia plasmónica producen un mejoramiento de campo local, el cual afecta los movimientos vibratorios de las moléculas cercanas a las nanopartículas metálicas, produciendo un mejoramiento significativo de la señal Raman. Los substratos SERS 3D estudiados en este trabajo, fueron fabricados en presencia de nanocelulosa bacteriana (BC) con nanopartículas metálicas de plata (Ag), oro (Au), silicio (Si) y grafeno oxidado (GO) por una vía de preparación in situ fácil, rápida y económica. Para la caracterización de estos substratos se utilizaron las técnicas de espectroscopia UV-Vis, EDS, Raman y microscopía SEM. Los resultados obtenidos demuestran la capacidad del GO de generar mayor producción de nanopartículas metálicas en el substrato, además de servir como trampa para concentrar una gran cantidad de

nanopartículas generando lugares de alta mejora en los sustratos. La presencia de silicio, nanopartículas metálicas y GO en los sustratos, permiten reducir considerablemente los efectos de fluorescencia en la molécula analito FITC, lo cual los convierte en posibles candidatos en aplicaciones de biosensado libre de etiquetas.

Objetivo General

Aprovechando las propiedades que brinda la nanocelulosa bacteriana (BC) y las posibles mejoras que ofrece el grafeno oxidado (GO) en substratos SERS, nos hemos propuesto como objetivo general de este trabajo, fabricar y caracterizar substratos SERS en ausencia y presencia de (GO), para analizar mediante comparativas las posibles ventajas que se presenten.

Objetivos Específicos

Para dar cumplimiento al objetivo general de este trabajo, hemos propuesto fabricar y caracterizar los siguientes substratos.

- Substratos SERS basados en nanocelulosa bacteriana con nanopartículas de plata (Ag) en presencia de silicio (Si).
- Substratos SERS basados en nanocelulosa bacteriana con nanopartículas de plata (Ag) y oro (Au).
- Substratos SERS basados en nanocelulosa bacteriana con nanopartículas de plata (Ag) y grafeno oxidado (GO).
- Substratos SERS basados en nanocelulosa bacteriana con nanopartículas de plata (Ag), oro (Au) y grafeno oxidado (GO).

La presentación de este trabajo involucra cinco secciones distribuidas de la siguiente manera, en la primera sección se hace una introducción general sobre el planteamiento del problema y su justificación, además se presenta una revisión general sobre los antecedentes de la espectroscopia SERS. Las siguientes secciones están distribuidas por capítulos.

Capítulo 1. Fundamentos teóricos: En este capítulo se hace una revisión general sobre los principios teóricos que fundamentan la espectroscopia Raman y las mejoras producidas por SERS.

Capítulo 2. Desarrollo experimental: En este capítulo se exponen las técnicas experimentales utilizadas para la fabricación y caracterización de los sustratos elaborados.

Capítulo 3. Análisis de resultados: En este capítulo se muestran los resultados obtenidos por espectroscopia UV-Vis, EDS, Raman y microscopía SEM, además se presenta un análisis sobre dichos resultados basándonos en los fundamentos teóricos.

Capítulo 4. Conclusiones: En este capítulo se presentan las conclusiones sobre la eficiencia de los sustratos y sobre las comparativas entre sustratos en ausencia y presencia de (GO).

Introducción

Cuando la radiación electromagnética interactúa con la materia, se pueden observar diferentes respuestas ópticas, dentro de las cuales se encuentran la reflexión, transmisión, difracción, interferencia, polarización, absorción y esparcimiento, entre otras. El análisis de estas respuestas ópticas nos permite hacer inferencias tanto de la naturaleza y propiedades de la radiación electromagnética, como de la materia que se está estudiando.^{1,2} Este análisis hace parte de las diferentes técnicas de espectroscopia tales como Ultravioleta-Visible (UV-Vis), fluorescencia, rayos x, emisión y absorción atómica, Infrarrojo (IR), Raman, etc. La espectroscopia Raman por ejemplo es una herramienta muy útil, porque brinda información sobre el espectro vibracional-rotacional de moléculas orgánicas y algunas inorgánicas, siendo complementaria en este aspecto con la espectroscopia IR.^{1,2} El principio sobre el que se sostiene la espectroscopia Raman, se fundamenta en la variación de la polarizabilidad molecular, mientras que la espectroscopia IR exige que haya un cambio en el momento dipolar eléctrico.^{3,4} Cuando interactúa radiación electromagnética con una molécula, el campo que incide sobre la molécula, genera movimientos vibratorios en los enlaces que sostienen a los átomos en la composición de la molécula, de tal manera que se produce un momento dipolar inducido. Este fenómeno puede ser interpretado como un esparcimiento de la radiación incidente causado por la molécula de estudio, dicho esparcimiento es de dos tipos, esparcimiento elástico (Rayleigh) en el cual no existe una diferencia de energías entre el fotón incidente y el fotón esparcido, y esparcimiento inelástico (Stokes y anti-Stokes), en el cual hay una diferencia de energías entre el fotón incidente y el fotón esparcido, correspondiente a un modo vibracional-rotacional de la molécula.^{1,2,4} Las vibraciones

moleculares dependen de la masa de los átomos, de la fuerza con que están enlazados esos átomos y del medio que los rodea.^{1,2,4} En algunas moléculas es difícil obtener un espectro Raman, ya que solo 1 de alrededor de 10^6 fotones que inciden sobre la molécula experimentan esparcimiento tipo Raman, es decir, cuenta con una sección eficaz muy baja, ya que ésta brinda información sobre la eficiencia en los procesos de absorción y esparcimiento.^{1,2,4} Para dar solución a este tipo de inconvenientes, se recurre a la mejora de la señal Raman por medio de sustratos que contienen nanoestructuras metálicas, a esta técnica se le conoce como espectroscopia Raman mejorada por superficie (SERS) por sus siglas en inglés.^{5,6} Esta mejora se debe a dos procesos principales, por una parte se considera el mejoramiento electromagnético (EM) que se deriva de la interacción de campos electromagnéticos con nanoestructuras metálicas, generando en estas un fenómeno conocido como resonancia de plasmónes localizados, los cuales dependen de la forma, tamaño y función dieléctrica del metal, y por otra parte se considera el mejoramiento químico o de transferencia de carga (TC) asociado al complejo de superficie metal-molécula.^{1,7} Para lograr una mejor amplificación de la señal, es necesario que la molécula (analito) sea adsorbida sobre la superficie del metal.^{1,2}

Son muchos los fenómenos que ocurren dentro de la espectroscopia SERS. Para dar explicación a estos fenómenos es necesario acudir a fundamentos físicos y químicos, además de ingenieriles para la elaboración de sustratos que nos permitan identificar sustancias de interés en diferentes campos de investigación, por ejemplo en biología es necesario detectar ADN, glucosa, proteínas y bacterias como la *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), en agroindustria es necesario identificar sustancias químicas como el glifosato que es ampliamente usado como herbicida y puede afectar la salud humana, en el

campo de la medicina, es necesario hacer seguimiento a virus y enfermedades como el cáncer, y en general en cualquier campo de estudio que involucre estructuras moleculares son de gran utilidad los substratos SERS.^{1,8,9}

En términos generales, un substrato SERS se puede definir como un soporte que alberga nanoestructuras metálicas que al interactuar con radiación electromagnética en condiciones de resonancia plasmónica, forman plasmónes de resonancia localizados, que a su vez son los encargados de amplificar la señal Raman.^{1,2,10} Existen diversos tipos de substratos SERS, el funcionamiento de dichos substratos depende de la longitud de onda de excitación, por lo cual para muchos experimentos de interés es necesario trabajar en la región del espectro visible e infrarrojo cercano, sin embargo, hay substratos que operan en otras regiones.^{1,2,10,11}

Un buen substrato puede contener preferiblemente nanopartículas metálicas de oro (Au) y plata (Ag), aunque se pueden utilizar otros metales nobles y algunos alcalinos.^{1,2,10} Estudios recientes en SERS reportan investigaciones sobre el uso de grafeno oxidado (GO) en la elaboración de substratos SERS en presencia y ausencia de nanoestructuras metálicas, aprovechando las propiedades mecánicas, eléctricas y ópticas que brinda este material. La forma de la nanopartícula y su rugosidad también son factores muy importantes para la amplificación de la señal, así como el número de hojas y grado de oxidación del GO.¹²⁻¹⁴

Otro aspecto importante que se debe considerar es el área superficial, ya que existe una relación directa entre el número de moléculas que se adhieren al substrato y la eficiencia en el esparcimiento.^{1,2} Factores adicionales y no menos importantes dentro de la fabricación de substratos SERS, son el bajo costo y la fácil fabricación, siendo esta una de las principales ventajas en la elaboración de nuestros substratos SERS, ya que es un método sencillo y usa

como plataforma la nanocelulosa bacteriana (BC) por su alta transparencia y nanofibras que ayudan a contener un mayor número de nanopartículas. Por último hay que considerar la afinidad que puede haber entre el substrato y la molécula (analito), ya que algunos substratos son más afines con cierto tipo de moléculas.^{1,2}

Como se ha mencionado anteriormente, la espectroscopia SERS involucra varios fenómenos físicos y químicos, siendo piezas importantes el esparcimiento Raman, los plasmónes de superficie localizados (LSPR) y la adsorción molecular.^{5-7,15} A continuación se señalan algunos aspectos y características a considerar dentro de la espectroscopia SERS. La razón entre la señal Raman amplificada por SERS y la señal Raman original, genera una magnitud conocida como factor de mejoramiento analítico (AEF) el cual está definido como:

$$AEF = \frac{\frac{I_{SERS}}{C_{SERS}}}{\frac{I_{RS}}{C_{RS}}} \quad (1)$$

Donde I_{SERS} es la intensidad de la señal Raman mejorada, I_{RS} es la intensidad de la señal Raman original, C_{SERS} la concentración molar del analito en el substrato plasmónico y C_{RS} la concentración molar del analito en ausencia de nanopartículas metálicas. Esta magnitud es crucial en SERS, puesto que ayuda a entender el mejoramiento electromagnético (EM) de la señal y nos proporciona una estimación de que tanto se ha amplificado la señal Raman mejorada con respecto a la señal Raman original.^{1,16} Sin embargo, ha sido un tema de debate, debido a que no tiene en cuenta el número de moléculas que están aportando a la señal SERS.^{1,2} La máxima amplificación ocurre en lugares específicos sobre la superficie del metal donde el campo electromagnético es más intenso, a estos sitios comúnmente se les llama

puntos calientes (hot spots) y únicamente las moléculas cercanas a dichos puntos podrán aportar a la amplificación de la señal.^{1,2,5,11} Estos máximos son del orden de 10^6 para nanopartículas esféricas, aunque se han reportado mejoramientos del orden de 10^{11} para nanopartículas con geometrías más complejas, lo que indica que este tipo de sustratos pueden detectar moléculas individuales.¹ El promedio del factor de mejoramiento SERS (PEF) se calcula sobre todas las posibles posiciones de la superficie metálica donde se puedan adsorber moléculas, dicho promedio alcanza valores de hasta 10^6 y en algunos casos bajo condiciones bien controladas se pueden obtener valores del orden de 10^8 . Las señales SERS también pueden mostrar una intensidad anómala, fluctuaciones que no están presentes en la señal Raman original, y pueden estar asociadas a cambios en el sustrato.^{1,2,5} En la mayoría de los casos, las moléculas de estudio exhiben un espectro SERS muy similar a su espectro Raman original, muchos picos que son huellas dactilares de la molécula aparecen en ambos espectros, sin embargo, existen algunas pequeñas diferencias entre ambas señales y deben ser tenidas en cuenta porque brindan información adicional sobre el efecto SERS.^{1,5,6}

El espectro Raman bajo condiciones SERS puede verse afectado, debido a que las resonancias plasmónicas son típicamente dependientes de la longitud de onda de excitación, como consecuencia de esto, las diferentes bandas del espectro pueden amplificarse en diferentes órdenes de magnitud, dependiendo del esparcimiento y de la resonancia plasmónica que produce la mejora.^{1,2,6} Efectos secundarios pueden surgir de la orientación particular de la molécula en la superficie y del modo Raman específico.¹ Por otra parte, la molécula puede modificarse con la adsorción y convertirse en un complejo de superficie (metal-molécula), lo cual puede verse reflejado en pequeños cambios que experimenta la señal Raman.^{8,15} En casos más extremos, los modos Raman que son fácilmente visibles en

la molécula desnuda pueden desaparecer tras la interacción con la superficie metálica, así como otros modos pueden surgir de la interacción entre la molécula y el metal.^{1,2,8,15} Las intensidades intrínsecas de la señal Raman (secciones eficaces) también pueden ser modificadas con la adsorción. A estos últimos efectos generalmente se les clasifica dentro del mejoramiento químico o de transferencia de carga (TC).^{1,2,10,11}

La señal SERS a veces aparece con un ruido de fondo provocado por diferentes fenómenos físicos; por ejemplo, efectos de fluorescencia intrínseca residual e impurezas en la muestra cómo se puede observar en la Fig. 1. A este amplio trasfondo a menudo se le llama continuo SERS.^{1,2,10} El fotoblanqueo también es un factor a considerar, ya que muchas sondas SERS tales como los tintes orgánicos, son conocidos por ser fotoblanqueadores cuando la potencia de excitación es muy alta. El mejoramiento electromagnético (EM) puede afectar drásticamente el fotoblanqueo, debido a la aparición de nuevos fenómenos fotoquímicos, como lo intuyen algunos investigadores, ya que los detalles exactos aún no están comprendidos completamente.^{1,2,10}

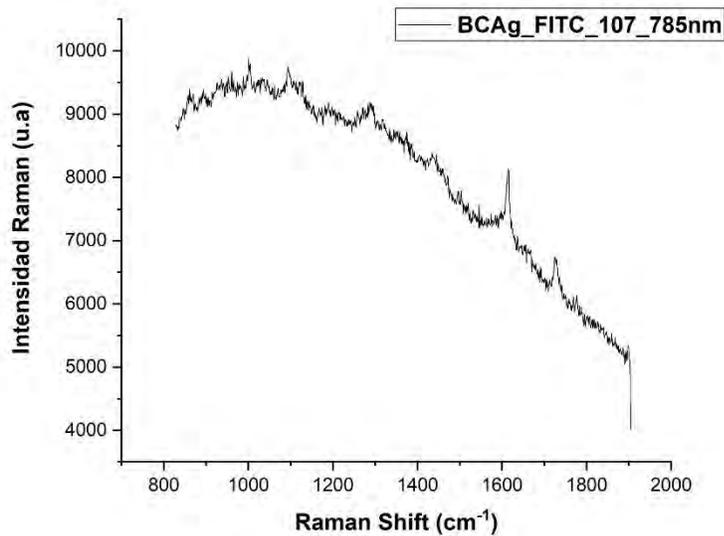


Figura 1. Espectro Raman del FITC a una concentración de $10^{-7}M$ sobre un sustrato basado en nanopapel de celulosa con nanopartículas de Ag, excitado a una longitud de onda $\lambda=785nm$. Se observan picos de la cinta adhesiva con la que se sujetó el sustrato, además de efectos de fluorescencia, lo cual impide observar claramente el espectro del FITC.

Con el fin de explorar el estado del arte del SERS, a continuación se presentan algunos antecedentes.

Antecedentes

A comienzos de la década de 1970's, diferentes grupos de investigación estaban dedicados a estudiar las posibles formas de observar monocapas de moléculas en superficie. El objetivo ya se había conseguido en ese momento para algunas técnicas, como es el caso de la espectroscopia IR. En un principio se pensó que no era posible lograr este objetivo con la espectroscopia Raman por la debilidad de la señal.^{1,2,10,11} No obstante, el trabajo desarrollado por Fleischman *et. al* sobre la piridina en electrodos de plata rugosos, dio origen a lo que se conoce como la primer observación del efecto SERS en 1974.^{1,2,10} La idea original que daba

explicación al aumento de la intensidad de la señal de piridina, estaba relacionada con el aumento del área superficial del electrodo usado como substrato, ya que se podrían unir un mayor número de moléculas que darían un aumento significativo a la señal. Sin embargo, surgieron otros fenómenos de amplificación que no pudieron ser explicados por esta hipótesis.¹⁰ Algunas de las observaciones mostraban que la señal podía debilitarse por el aumento de la rugosidad del electrodo contradiciendo la hipótesis planteada. Van Duyne *et. al* y Creighton *et. al* demostraron que el mejoramiento de la señal Raman bajo efecto SERS no solo se debía al aumento del área superficial, sino que además existía una forma diferente de mejoramiento actuando sobre las intensidades Raman de las moléculas.^{1,2,10}

En la década de 1980's Moskovits realizó un trabajo sobre los avances teóricos y experimentales en SERS hasta ese momento.¹¹ En la década de 1990's no hubo avances particularmente significativos en SERS, pero con las mejoras de la instrumentación Raman, diferentes campos científicos tuvieron un mayor acceso al estudio de la técnica, colaborando de esta manera en el desarrollo progresivo de la nanociencia y la nanotecnología que abrieron muchas posibilidades nuevas, especialmente en términos de diseño y fabricación de substratos SERS.^{1,10}

El desarrollo de la nanotecnología después del 2000, permitió el progreso en la preparación de nanoestructuras plasmónicas para aplicaciones analíticas y de detección. Kenneth Crozier y Wenqi Zhu reportaron publicaciones sobre la fabricación litográfica de dímeros de oro con huecos a escala de Angstrom. Dichas estructuras permitieron estudiar el impacto del efecto túnel de electrones en la mejora plasmónica de campo cercano a través de SERS.¹ Zhong-Qun Tian y Jian-Feng Li *et. al*, reportaron estudios sobre la espectroscopia Raman mejorada

con nanopartículas aisladas por concha (SHINERS), esta nueva técnica amplió la generalidad de SERS y abrió el camino para investigar muchos procesos químicos, electroquímicos, biológicos y catalíticos.^{2,10,11} El hecho de que los substratos SERS tuvieran la capacidad de detectar una sola molécula, motivó a los investigadores para desarrollar teoría y nuevos experimentos alrededor de SERS.² Recientemente se han reportado diversas investigaciones sobre películas flexibles con nanopartículas de Ag, utilizando láminas de GO como substratos. Las hojas a base de GO han sido utilizadas como un fuerte soporte para dispersar y estabilizar nanopartículas. Las películas de Ag ensambladas en láminas de GO son flexibles y pueden formar suspensiones estables en solución.¹⁷⁻¹⁹ Las nanopartículas de Ag recubiertas por una película de GO, muestran señales Raman mejoradas gracias a las hojas de GO y a la densidad de nanopartículas de Ag en la película, tales películas activas SERS pueden tener algunas ventajas en cuanto a selectividad y sensibilidad como substratos genéricos de SERS, para el estudio de la electrónica y características estructurales de las láminas de GO.²⁰⁻²² También se han reportado nanoestructuras tipo sándwich incrustadas con GO para SERS, encontrando posibles aplicaciones en seguimiento de pesticidas. Siguiendo este enfoque, muchos investigadores han fabricado nanoestructuras híbridas que integran GO con diversas nanopartículas de Ag y Au, controlando su forma y tamaño. Los substratos SERS que involucran nanoestructuras metálicas híbridas con GO han sido ampliamente investigados y se han reportado mejoras sustanciales en las señales SERS.²³⁻²⁷ Guo J, *et. al* fabricaron un substrato SERS a base de silicio en forma piramidal, dopada con nanopartículas de Ag y algunas capas de GO adheridas por centrifugado. Este substrato presentó un límite de detección (LOD) de 10^{-11} M y un factor de mejoramiento de 1.26×10^{12}

para Rodamina 6-G (R6G). El mejoramiento de la señal se debe a la amplificación del campo eléctrico cuando la pirámide de silicio hace contacto con las nanopartículas metálicas.²⁸

X. Zhao. *et. al*, reportaron un método alternativo para fabricar un sustrato SERS flexible tridimensional (3D) basado en GO y nanopartículas de Ag, con lo que lograron un (LOD) para (R6G) de 10^{-10} M y para cristal violeta (CV) de 10^{-9} M. El GO fue usado como una película protectora y un excelente adsorbente para sondear moléculas, produciendo una gran contribución a la estabilidad de las señales SERS. También reportaron mejoras en la detección de malaquita verde en solución (MG) logrando un (LOD) de 10^{-10} M.¹³

G. Shi. *et. al* fabricaron un sustrato de microislas de Ag recubiertas con hojas de GO. Usando CV como molécula de sonda mostraron un factor de mejoramiento de 1.52×10^6 . Las pruebas de sensibilidad indicaron que el (LOD) para CV era tan bajo como 5×10^{-10} M, también se reportó sobre la estabilidad temporal del sustrato durante 30 días.²⁹

I. Khalil. *et. al* reportaron biosensores de ADN basados en SERS. El acoplamiento de dos plataformas que contienen nanopartículas metálicas y GO genera un (hot spot) de campo electromagnético mejorado localmente, formado en las uniones y grietas intersticiales de las nanoestructuras, en consecuencia proporciona amplificación significativa de la señal SERS.³⁰

J. Zhu. *et. al* prepararon sustratos que contienen nanohuesos de Au recubiertos de Ag decorados con GO y fue utilizado para detectar glucosa en orina, demostrando su utilidad en el biosensado.³¹

T. Naqvi. *et. al*, fabricaron un substrato activo SERS basado en nanopartículas de Ag (AgNPs) y óxido de grafeno reducido (rGO). El substrato (rGO/AgNPs) mostró buena homogeneidad, estabilidad y sensibilidad nanomolar con mejora de intensidad Raman de 10^5 para (R6G) y una mejora de 10^3 para ácido 4-mercaptobenzoico (4-MBA) y para 2-4 dinitrotolueno (2,4-DNT). La mejora observada de la señal SERS para todos los analitos ha sido atribuida al efecto acumulativo de rGO y AgNPs.³²

Y. Li. *et. al*, reportaron un método rápido y amigable con el ambiente, desarrollado para preparar nanopartículas de Ag y rGO que exhibe favorable actividad de SERS en la detección de bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). La sensibilidad de detección del compuesto (AgNPs/rGO) fue de 2×10^8 CFU/cm³.³³

Los substratos SERS con superficie mejorada en papel reciben mucha atención debido al bajo costo y alta flexibilidad. G. Xiao. *et. al* desarrollaron un substrato SERS (S-rGO/AgNPs) eficiente mediante impresión en huecograbado de película delgada de óxido de grafeno sulfonado reducido (S-rGO) e impresión de inyección de tinta de AgNPs. Este substrato presentó un factor de mejoramiento del orden de 10^9 y un límite de detección para MG y R6G del orden de 10^{-7} M, además exhibió una buena uniformidad y estabilidad a largo plazo.³⁴

P. Chettri. *et. al* reportaron la síntesis de rGO y AgNPs, usando extracto acuoso de hojas secas de *Psidium guajava*. El compuesto de rGO mostró un rendimiento notable en la detección de azul de metileno con concentración tan baja como 10^{-8} M para la cual el factor de mejora fue de 4.6×10^5 . Además, reportaron que el rGO apaga la fluorescencia del azul de metileno más eficientemente.³⁵

A pesar de que todavía se está trabajando mucho en términos de comprensión fundamental del efecto, muchas publicaciones sobre sustratos SERS están dedicadas al estudio de sus aplicaciones, ya sea como herramienta de investigación o para su comercialización.^{1,2,8,10,11,15} Otras investigaciones recientes sobre sustratos SERS que contienen GO y rGO se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. *Parámetros asociados a la sensibilidad de los sustratos SERS que contienen nanopartículas metálicas, (GO) y (rGO).*

Substrato	Límite de detección	Factor de mejoramiento	Analito	Referencia
3D(AgNPs/GO)	10 ⁻¹⁵ M 10 ⁻¹² M	7x10 ⁸ 3.2x10 ⁸	R6G CV	12
Ag@GO	10 ⁻¹³ M	3.4x10 ⁵	R6G	36
GO	---	---	TSCuPc	37
Ag-COFe ₂ O ₄ /rGO	10 ⁻⁹ M	---	Hg ²⁺	38
Ag/PAA/GO Ag/PAA/rGO	---	6.1x10 ⁴	4-ATP	39
phc-AgNPs	10 ⁻⁶ M	---	p-metiltiofeno	40
GO-GNS	10 ⁻⁶ M	---	bilirubina sérica	41
rGO-NP	10 ⁻¹⁰ M	---	R6G	14
Polimeros-GO-AgNPs	10 ⁻¹¹ M	3.95x10 ⁷	Propanol	42
GO-NRS-AuNPs	10 ⁻⁶ M	---	Ni ²⁺	43
GO-AuNPs	10 ⁻⁹ M	---	Hg ²⁺	44
AgNPs/rGO	10 ⁻⁶ M	---	Fluoresceína	45
BW/GO/AgNPs	10 ⁻⁹ M 10 ⁻⁸ M	4.79x10 ⁶	CV MBA	46
Ag/GO/TNR	10 ⁻¹² M	5.8x10 ⁵	R6G	47
TiO ₂ /Au/rGO	10 ⁻¹⁰ M	---	R6G	48
ZnO/Gr/AgNPs	10 ⁻¹⁵ M	0.95x10 ¹²	R6G	49
GO/AgNPs/Cu	10 ⁻⁸ M	1.2x10 ⁶ 1.56x10 ⁵	CV MG	50
AgNPs/GO	10 ⁻¹² M	10 ¹⁰	2,4-DNT	51
GO/Ag	10 ⁻⁶ M 10 ⁻⁹ M	---	Paradoxon R6G	52
GO/AgNPs	10 ⁻⁸ M	---	Clenbuterol	53
GO/PDDA/AgNPs	10 ⁻⁹ M	3.01x10 ⁷	R6G	54
GO-Au	10 ⁻⁶ M	8.1x10 ⁷	R6G	55
AuNPs-GO	10 ⁻⁹ M	---	MG	56

Tabla 2. *Parámetros controlables en la elaboración de substratos SERS que contienen nanopartículas metálicas, (GO) y (rGO).*

Substrato	Método de crecimiento de las nanopartículas	Tamaño de la nanopartícula	Forma de la nanopartícula	Número y tamaño de capas de GO/rGO	Referencia
3D(AgNPs/GO)	Deposición	45 nm	Multicapas	1-6	12
Ag@GO	---	2 nm	Flores	---	36
GO	---	---	---	3 capas/4.3 nm	37
Ag-COFe ₂ O ₄ /rGO	Reacción asistida por microondas	10 nm	Nanocompuestos	---	38
Ag/PAA/GO Ag/PAA/rGO	Reducción química; Crecimiento lateral	200 nm longitud X 40 nm espesor	Nanoplatos	3 capas	39
phc-AgNPs	Autoensamblaje	30 nm	Esférica	---	40
GO-GNS	Reducción	30 nm	Estrellas	---	41
rGO-NP	E-Beam	150 nm	Nanoprismas	---	14
Polimeros-GO-AgNPs	---	50 nm	Esférica	---	42
GO-NRS-AuNPs	Reducción	80-100nm	Hilos	---	43
GO-AuNPs	Reducción	100-200nm	Islas	---	44
AgNPs/rGO	Reducción química	20 nm	Esférica	---	45
BW/GO/AgNPs	Reducción	1 μm	Alas de mariposa	---	46
Ag/GO/TNR	Deposición	50 nm	Hilos	---	47
TiO ₂ /Au/rGO	Hidrotermal	50 nm	Nanocompuestos	---	48
ZnO/Gr/AgNPs	Deposición	18-30nm	Microcavidades	---	49
GO/AgNPs/Cu	Centrifugado	---	Palomitas de maíz	---	50
AgNPs/GO	Ablación laser	20 μm	Nanohojas	---	51
GO/Ag	Reducción	8nm	Nanocompuestos	---	52
GO/AgNPs	Deposición	10nm	Nanocompuestos	---	53
GO/PDDA/AgNPs	Reducción	---	Nanocompuestos	---	54
GO-Au	Crecimiento in situ	20nm	Nanocompuestos	---	55
AuNPs-GO	Reducción	20-80nm	Nanocompuestos	---	56

Capítulo 1. Fundamentos Teóricos

1.1. La espectroscopia Raman

El fenómeno de esparcimiento Raman fue observado por primera vez por Chandrasekara Venkata Raman en 1921 en India, lo que lo llevó a obtener el premio Nobel de física en 1930.^{1,2,4,9} Lo que Raman observó fue un nuevo tipo de radiación secundaria, el cual se conoce actualmente como esparcimiento Raman. El análisis de la radiación que emerge del esparcimiento Raman recibe el nombre de espectroscopia Raman.^{1,2} El esparcimiento Raman se produce por la absorción-emisión “instantánea” de fotones cuando la radiación electromagnética interactúa con la materia. Dicho esparcimiento puede ser clasificado en dos tipos:^{1,4}

- ✓ **Esparcimiento elástico:** se presenta cuando el fotón incidente con energía E_L y el fotón esparcido con energía E_S tienen la misma energía $E_L = E_S$, aunque pueden diferir en dirección y polarización. A este tipo de esparcimiento comúnmente se le conoce como esparcimiento Rayleigh. Sin embargo, no es de mucho interés en la espectroscopia Raman puesto que no hay un cambio significativo en la molécula de estudio al interactuar con los fotones y por lo tanto no brinda información química.^{1,4,15} Ver diagrama de energías en la Fig. 2.
- ✓ **Esparcimiento inelástico:** se presenta cuando el fotón esparcido tiene una energía E_S diferente a la energía E_L del fotón incidente. La diferencia de energías corresponde a la energía de transición entre dos estados vibracionales-rotacionales

de la molécula.^{1,4,15} Este proceso se puede ver ilustrado en el diagrama de la Fig. 2.

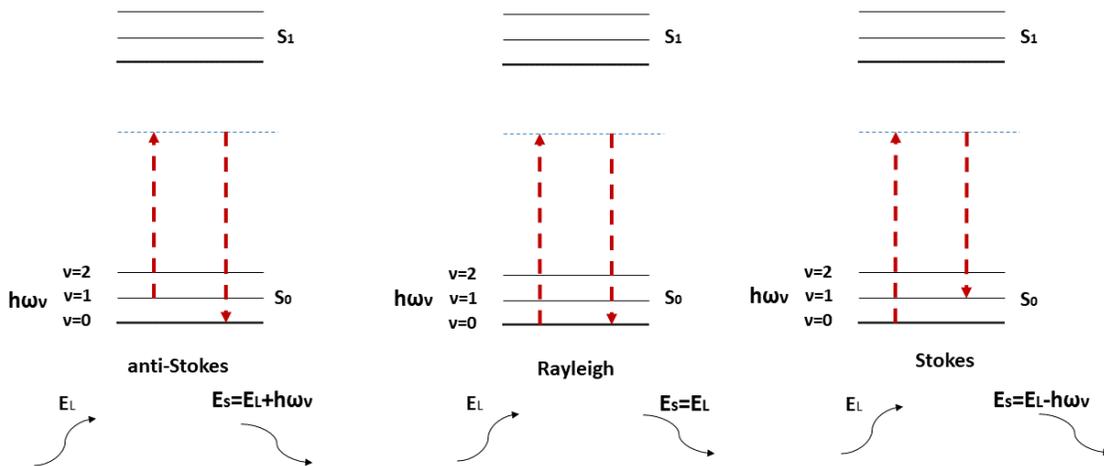


Figura 2. Diagrama de niveles de energía de los procesos anti-Stokes, donde la energía del fotón esparcido es mayor a la del fotón incidente, Rayleigh, en el cual la energía del fotón esparcido es igual a la del fotón incidente, y Stokes, en el cual la energía del fotón esparcido es menor a la del fotón incidente.

Un aspecto importante dentro del esparcimiento inelástico en relación a la energía del fotón esparcido E_S , es que dicha energía puede ser mayor o menor que la energía del fotón incidente E_L .^{1,4} Si el fotón esparcido tiene menor energía a la del fotón incidente $E_S < E_L$, decimos que es un proceso Stokes y puede interpretarse como la excitación de la molécula desde su estado vibracional base v_0 a un estado virtual y relajarse al primer estado excitado v_1 de un modo vibracional, con energía $h\omega_v = E_L - E_S$ correspondiente a la vibración como se puede observar en la Fig. 2, siendo $\hbar = 1,05457 \times 10^{-34}$ J s la constante de Planck y ω_v la frecuencia de vibración del modo. En caso de que el fotón esparcido tenga una mayor energía a la del fotón incidente $E_S > E_L$, entonces lo llamamos proceso anti-Stokes y puede

ser explicado como una excitación de la molécula de estudio desde un estado vibracional excitado v_1 hasta un estado virtual y relajarse a su estado base v_0 , cuya energía de vibración está dada por $\hbar\omega = E_S - E_L$ cómo se puede observar en la Fig. 2.¹ Para que ocurra un proceso anti-Stokes, es necesario que la molécula se encuentre en un estado vibracional excitado, esto se puede lograr a través de excitación térmica, lo cual implica que la señal anti-Stokes depende de la temperatura de equilibrio (T) por medio de la distribución de Boltzman.^{1,2,9}

$$F(\text{Estado}) = \exp\left(\frac{-\hbar\omega_v}{K_B T}\right) \quad (2)$$

Donde $K_B = 1,380649 \times 10^{-23}$ J / K es la constante de Boltzman. Es importante aclarar que las señales Raman Stokes y anti-Stokes son simétricas respecto a la señal de Rayleigh, siendo mayor en intensidad la señal Stokes, tal y como se observa en la Fig. 3.

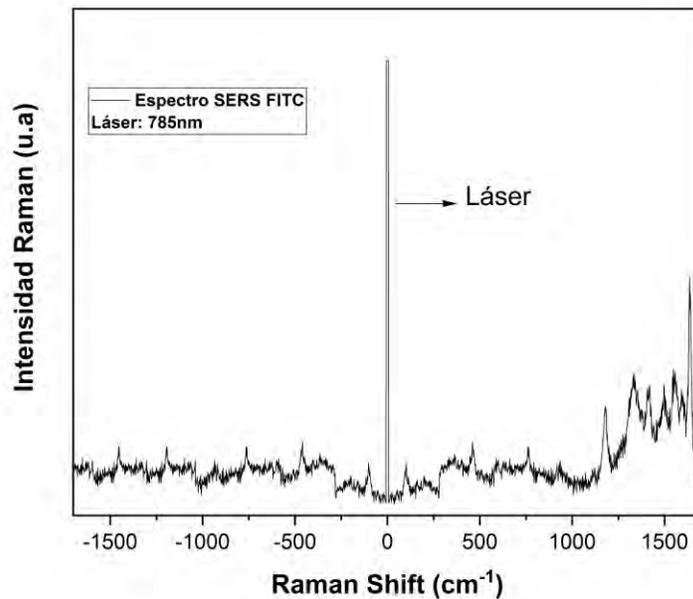


Figura 3. Esquema de un espectro Raman del FITC, donde se puede observar la simetría de las bandas Stokes y anti-Stokes con respecto a la línea Rayleigh del láser.

El esparcimiento Raman se parece al efecto de fluorescencia, sin embargo, se pueden diferenciar gracias a que el proceso de esparcimiento Raman ocurre de manera “instantánea”, mientras que el efecto de fluorescencia involucra un paso intermedio, que se interpreta como una excitación electrónica seguida por una emisión con un tiempo de vida finito.^{1,2,8}

Las reglas de selección para las transiciones Raman involucran aspectos relacionados con la polarizabilidad α de la molécula como respuesta a un campo eléctrico. Su origen puede ser explicado desde el punto de vista clásico, en el cual se considera la variación en el tiempo de la magnitud del momento dipolar inducido

$$P = \alpha E \quad (3)$$

en una molécula, al interactuar con un campo electromagnético.^{1,3}

$$E(t) = E_0 \cos(\omega t) \quad (4)$$

Asumiendo que la radiación incidente tiene una frecuencia ω y la polarizabilidad α de la molécula cambia entre valores de α_{\min} y α_{\max} a una frecuencia ω_0 , entonces podemos escribir el momento dipolar inducido como.^{2,3,8}

$$p = \alpha_0 E_0 \cos(\omega t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 \cos(\omega_0 t) E_0 \cos(\omega t) \quad (5)$$

Usando la identidad trigonométrica

$$\cos(a)\cos(b) = \frac{1}{2} (\cos(a+b) + \cos(a-b)) \quad (6)$$

podemos reescribir el momento dipolar como:

$$p = \alpha_0 E_0 \cos(\omega t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 \cos(\omega_0 - \omega)t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 \cos(\omega_0 + \omega)t \quad (7)$$

El primer término del momento dipolar está asociado con la frecuencia de radiación incidente ω y da razón de la banda Rayleigh, los otros dos términos están relacionados con el corrimiento en frecuencia por la frecuencia ω_0 a la cual el movimiento molecular causa la polarizabilidad al oscilar, y brinda información de las bandas Stokes y anti-Stokes en el espectro Raman.³

Función sección eficaz Raman σ_{RS}

La intensidad de la señal Raman I_{RS} está asociada con la función (sección eficaz), y es proporcional al flujo incidente de fotones I_0 , es decir,

$$I_{RS} = \sigma_{RS} I_0 \quad (8)$$

La constante de proporcionalidad conocida como sección eficaz Raman σ_{RS} , tiene dimensiones de cm^2 y es función de la frecuencia de excitación.^{1,2,8,9} La sección eficaz Raman es proporcional al cuadrado de la derivada de la polarizabilidad α' para la transición

vibratoria m_n , y también es proporcional a la cuarta potencia de la frecuencia de esparcimiento ω_s , es decir,

$$\sigma_{RS} = C\omega_s^4 |\alpha'_{mn}|^2 \quad (9)$$

donde C es constante. Las eficiencias de los procesos de absorción y esparcimiento están determinadas por la función sección eficaz, que es el punto de encuentro entre los experimentos y la teoría.^{1,2,8} La sección eficaz se puede interpretar como el área objetivo presentada por una molécula o partícula para generar esparcimiento o absorción. Las secciones eficaces para esparcimiento Raman son del orden de 10^{-29} , mientras que para los procesos Raman resonantes en SERS (SERRS) y para SERS son del orden de 10^{-15} y 10^{-16} respectivamente.^{1,2,4,8}

1.2. Espectroscopia Raman mejorada por superficie (SERS)

Fleischmann *et. al* en 1974 observaron el efecto SERS cuando intentaban registrar el espectro Raman de la piridina sobre un electrodo de plata sometido a ciclos de oxidación-reducción.^{1,2,10,11} En un comienzo se creyó que la intensificación de la señal Raman se debía al incremento del área superficial producida por el proceso de reducción, pero luego se demostró que este no era el único efecto que daba respuesta a dicha intensificación, puesto que algunas bandas Raman no se incrementaban al ampliar el área superficial, de esta manera nació la espectroscopia SERS en 1978.^{1,8,11} Hasta la fecha se han realizado diversos estudios teóricos y experimentales para comprender los fenómenos involucrados dentro de la

espectroscopia SERS. Se ha demostrado que el mejoramiento de la señal Raman, se debe al aumento del esparcimiento inelástico procedente de algunas moléculas rodeadas de nanopartículas metálicas, alcanzando una diferencia de intensidades en un factor de 10^6 con respecto a la señal de la molécula en ausencia de nanopartículas metálicas.^{2,5} Se ha demostrado también que la intensidad de la señal Raman depende de las características geométricas del metal empleado, la naturaleza de la molécula de estudio y algunas variables propias del experimento, como son, concentración molar (M), longitud de onda de excitación (λ), potencia de radiación incidente (P), etc. Es importante aclarar que la intensificación de la señal no es uniforme en todas las bandas del espectro Raman, algunas bandas se intensifican más que otras, dependiendo de las condiciones particulares de cada experimento.^{5,9}

1.3. Explicación de la intensificación en SERS por efectos electromagnéticos y de adsorción.

Para dar explicación a la intensificación de la señal Raman producida por efecto SERS, se aceptan actualmente dos tipos de contribuciones. Por una parte, se propone la existencia de un mejoramiento de intensificación electromagnético (EM), relacionado con los plasmónes de resonancia que se pueden originar en las nanopartículas metálicas en el sustrato.^{1,2,8} Por otro lado, se propone un mejoramiento químico o de transferencia de carga (TC), relacionado con la adsorción molecular.⁸ A pesar de que estos dos mejoramientos han sido ampliamente estudiados, actualmente siguen siendo tema de investigación.

Gracias a que el efecto SERS depende del momento dipolar inducido en la molécula, podemos esquematizar los aportes de las dos mejoras en la Fig. 4.

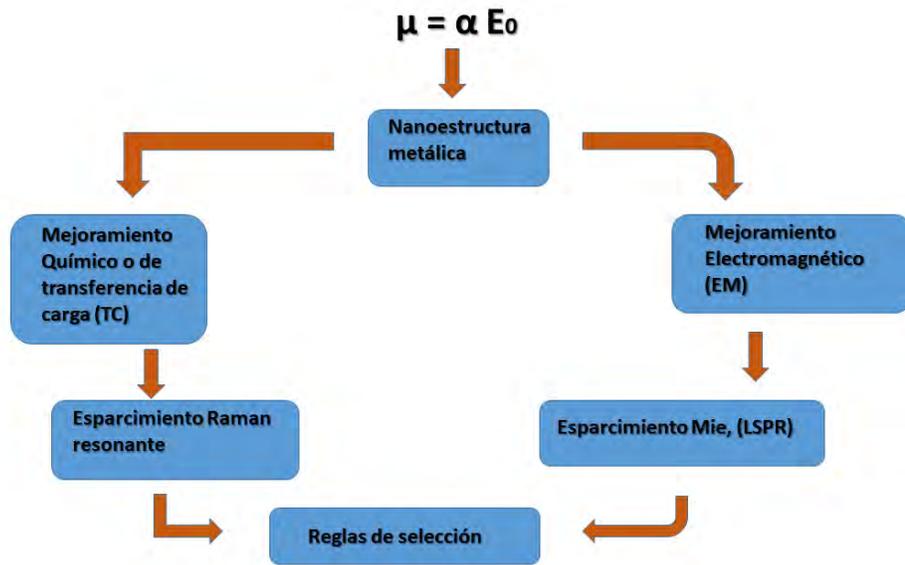


Figura 4. Diagrama que describe los aportes de cada mejoramiento en presencia de una nanoestructura metálica. El momento dipolar inducido en la molécula depende de la polarizabilidad α y del campo incidente E_0 , la alteración de estas dos variables son producidas por el mejoramiento electromagnético (EM) y de transferencia de carga (TC).

1.3.1. Mejoramiento por efectos electromagnéticos

El efecto SERS emerge de la relación que hay entre la molécula, la radiación electromagnética incidente y la nanoestructura metálica. Los procesos de absorción y esparcimiento de la luz por las nanopartículas metálicas en el sustrato, son relevantes en el estudio del efecto SERS.^{5,9} La frecuencia de resonancia de los plasmónes depende de la función dieléctrica del metal así como de la forma y tamaño de la nanopartícula. Para una nanopartícula suficientemente pequeña, todas las transiciones electrónicas interbanda se pueden despreciar, excepto el plasmón asociado al dipolo, conocido como aproximación

dipolar.^{5,6} La radiación dipolar emitida por la nanopartícula, llega a un estado estacionario unos femtosegundos después de haber interactuado con la radiación incidente del láser, y es caracterizada por una distribución espacial de las magnitudes del campo, donde la intensidad de la radiación es cero para regiones alejadas de la nanopartícula, mientras que en regiones cercanas es muy grande.^{1,2}

i. Respuesta óptica de un plasma de electrones libres.

Es bien sabido que los metales como el oro (Au), la plata (Ag), el cobre (Cu) o el aluminio (Al) tienen propiedades ópticas muy atractivas, por ejemplo, reflejan la luz visible de manera muy eficiente. Además, cuentan con propiedades físicas tales como la conducción del calor o la conductividad eléctrica, las cuales se pueden explicar por la presencia de electrones de conducción libres en el metal.^{1,2,5,6} Asumiendo que los electrones libres de un metal se mueven en un fondo de iones positivos fijos, se puede garantizar la neutralidad general del metal, lo que permite la presencia de un plasma de electrones libres. La respuesta óptica de este plasma de electrones libres regirá todas las propiedades ópticas de los metales, especialmente en la parte visible del espectro donde se encuentran sus resonancias plasmónicas.^{5,6} Para modelar la respuesta óptica de un plasma de electrones libres, es necesario determinar las ecuaciones constitutivas que relacionan las corrientes y cargas en el plasma con los campos electromagnéticos.^{1,6} Esta es una tarea muy difícil de abordar, ya que hay que considerar la interacción de electrones con la estructura periódica subyacente de iones, las correlaciones electrón-electrón, la interacción de electrones con impurezas y fonones, y la posible presencia de superficies. Una primera aproximación a esta respuesta óptica puede describirse usando el modelo de Drude.^{1,2,5}

ii. *Modelo de Drude*

El modelo de Drude nos ayuda a comprender de manera aproximada y simple el fenómeno de conductividad eléctrica. Una forma sencilla de introducir el modelo de Drude es utilizar el modelo de Lorentz para la polarización atómica.^{1,5,6} Este modelo describe la respuesta óptica de un electrón en un átomo o molécula, unido con una fuerza restauradora caracterizada por una frecuencia resonante ω_0 . Los electrones de conducción en un metal no están unidos y por lo tanto, en una primera aproximación, su dinámica se puede describir por el modelo de Lorentz haciendo $\omega_0 = 0$, es decir que no existen fuerzas restauradoras. Además, debido a que los electrones libres están distribuidos de manera uniforme y aleatoria en todo el metal, sus contribuciones a la susceptibilidad óptica total son simplemente la suma de sus polarizaciones individuales, sin ninguna corrección de campo local.^{1,2,5,6} La función dieléctrica relativa de Drude de un metal brinda la información necesaria para explicar la resonancia de plasmónes y puede obtenerse tomando $\omega_0 = 0$ en el modelo de Lorentz, es decir:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{ne^2}{m\varepsilon_0} \frac{1}{\omega^2 + i\gamma_0\omega} \quad (10)$$

Donde n es el número de electrones libres por unidad de volumen y m su masa. El término de amortiguamiento γ_0 corresponde a la tasa de colisión de electrones libres con impurezas en la muestra y también da razón de la resistividad eléctrica. Por lo general, γ_0 se puede considerar pequeño en comparación con ω en las regiones de interés. En una primera

aproximación, los iones positivos en el metal, contribuyen a una función dieléctrica real de fondo constante $\epsilon_\infty = 1$ lo cual afecta la respuesta óptica del metal y la dinámica de los electrones libres. Teniendo en cuenta lo anterior en el modelo de Drude, obtenemos una expresión ligeramente modificada para $\epsilon(\omega)$, es decir:^{1,5}

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_\infty \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_0\omega} \right) \quad (11)$$

En ausencia de una perturbación externa, la densidad de carga de un plasma se puede considerar uniforme. Se define entonces

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{n\epsilon_0\epsilon_\infty}} \quad (12)$$

como la frecuencia de oscilación natural de la densidad de carga del plasma de electrones libres, por lo cual se denomina frecuencia de plasma, también se puede definir la longitud de onda correspondiente a dicha frecuencia de plasma

$$\lambda_p = 2\pi \frac{c}{\omega_p} \quad (13)$$

Separando la parte real e imaginaria de la función dieléctrica $\varepsilon(\omega)$ en la Eq. (11), tenemos:^{1,2}

$$\text{Re}(\varepsilon(\omega)) = \varepsilon_{\infty} \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma_0^2} \right) \quad (14)$$

$$\text{Im}(\varepsilon(\omega)) = \left(\frac{\varepsilon_{\infty} \omega_p^2 \gamma_0}{\omega(\omega^2 + \gamma_0^2)} \right) \quad (15)$$

Recordando que γ_0 es pequeño en comparación con ω , vemos que para $\omega < \omega_p$ en un plasma descrito por el modelo de Drude, se cumple que $\text{Re}(\varepsilon(\omega)) < 0$, y la absorción caracterizada por $\text{Im}(\varepsilon(\omega))$ también se hace cercana a cero en esta región. Son estas dos condiciones las que hacen posible las resonancias de plasmónes. Estas condiciones nunca se cumplen en dieléctricos estándar en los cuales la parte $\text{Re}(\varepsilon(\omega))$ tiene valores entre 1 y 10 aproximadamente.^{1,7} Para muchos metales, la frecuencia de plasma se encuentra en la parte UV del espectro electromagnético, lo cual implica que para efectos prácticos en substratos SERS, es necesario llevar esa frecuencia de resonancia a regiones de interés tales como el visible, UV e infrarrojo cercanos.^{2,15}

iii. *El efecto plasmónico en SERS.*

El término plasmón fue acuñado por Pines en 1956, definiéndolo como una cuasi partícula que representa las excitaciones elementales, o modos, de las oscilaciones de densidad de carga en un plasma.^{1,5,6} Cuando hacemos incidir radiación electromagnética sobre una interface metal-dieléctrico se produce la excitación de los plasmónes de superficie (SPs), generando ondas electromagnéticas que se propagan a través de la interface, este fenómeno es conocido como polaritones de plasmónes de superficie (SPP), el cual se esquematiza en la Fig. 5 (A). Estas oscilaciones quedan fuertemente confinadas en la interface metal-dieléctrico, similar a una guía de ondas, disminuyendo la amplitud a medida que se propagan (ondas evanescentes).^{5,6} Para nanopartículas metálicas, los (SPPs) dejan de existir y los modos electromagnéticos que se presentan, se conocen como plasmónes de superficie localizados (LSP), los cuales dependen de las condiciones de contorno.^{1,2} Para una nanopartícula metálica con dimensiones muy pequeñas comparadas con la longitud de onda de la radiación incidente $d \ll \lambda$, siendo d el diámetro de la nanopartícula metálica, los (SPP) se encuentran localizados formando (LSP) que entran en resonancia a una frecuencia determinada, la cual depende de la función dieléctrica, la morfología y el tamaño de la nanopartícula. Cuando se cumplen las condiciones de resonancia, los (LSP) son excitados y aparece el fenómeno conocido como resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) por sus siglas en inglés, que a su vez conduce a la polarización de la nanopartícula como se ilustra en la Fig. 5 (B).^{1,5,11}

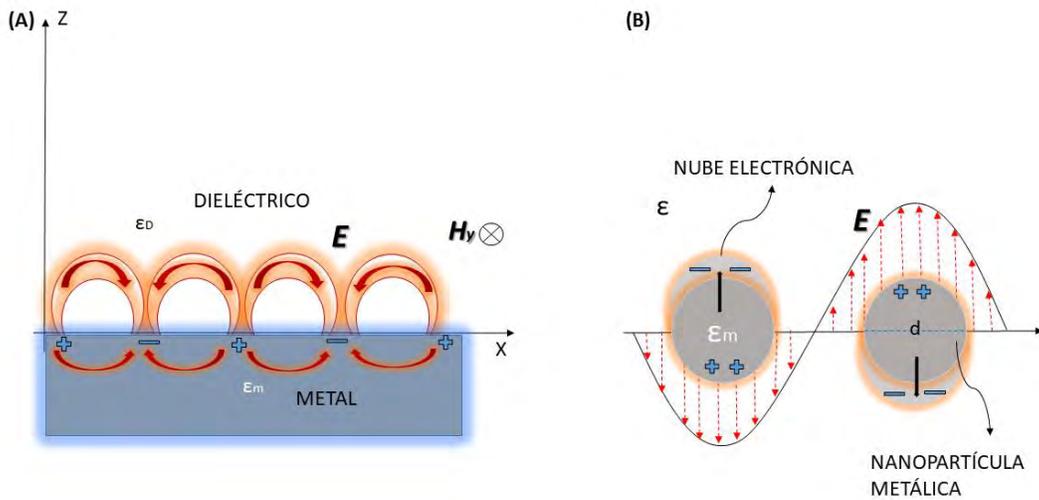


Figura 5. Representación esquemática de (A) plasmónes polaritones de superficie (SPP) propagándose en la interface metal-dieléctrico y (B) resonancia de plasmónes de superficie localizados (LSPR) en nanopartículas metálicas.

iv. El efecto de los (LSPR) sobre nanopartículas metálicas.

Las nanopartículas metálicas de (Ag), (Au) y (Cu) presentan (LSPR) con resonancias en la región del espectro visible. Las frecuencias de resonancia de los (LSPR) pueden ser moduladas para un mismo metal cambiando el tamaño, la forma, la rugosidad de la superficie y la distancia entre partículas. La absorción y el esparcimiento de la luz generados por la interacción con nanopartículas, es un problema que ya se ha abordado desde el punto de vista clásico, se encuentran soluciones analíticas para partículas con formas simples como cilindros, esferas o elipsoides. Para las nanopartículas con geometrías complejas se requieren métodos numéricos.^{1,2}

Con el objetivo de ilustrar mejor el fenómeno de resonancia plasmónica, tomamos como ejemplo el modelo de una esfera metálica, la cual al interactuar con un campo externo, se polariza y experimenta un momento dipolar inducido que se puede escribir como:

$$\mu(\omega) = 4\pi\epsilon_0 a^3 \frac{\epsilon(\omega) - 1}{\epsilon(\omega) + 2} E_0 = G E_0 \quad (16)$$

Donde $\epsilon(\omega)$ es la función dieléctrica del metal, ϵ_0 la permitividad eléctrica en el vacío, E_0 el campo incidente y a el radio de la esfera. En los metales, la parte real de la función dieléctrica puede ser negativa, debido a la diferencia de fase que existe entre el campo eléctrico externo y la polarización inducida, para los casos en los que se cumple $\text{Re}(\epsilon(\omega)) \approx -2$, y $\text{Im}(\epsilon(\omega)) \approx 0$, se cuenta con las condiciones necesarias para que se produzca una intensificación por (LSPR).^{1,6} En el esquema de la Fig. 6 se puede apreciar la diferencia del esparcimiento Raman en presencia y ausencia de nanopartículas metálicas. La intensificación que presentan las señales Raman en presencia de nanopartículas metálicas es debida a los aportes de dos procesos. Por un lado, existe un aporte de la intensificación del campo electromagnético incidente sobre la molécula, y por otro, el aporte de la intensificación de la radiación Raman como se puede apreciar en la Fig. 6 **(B)**.^{1,2,6}

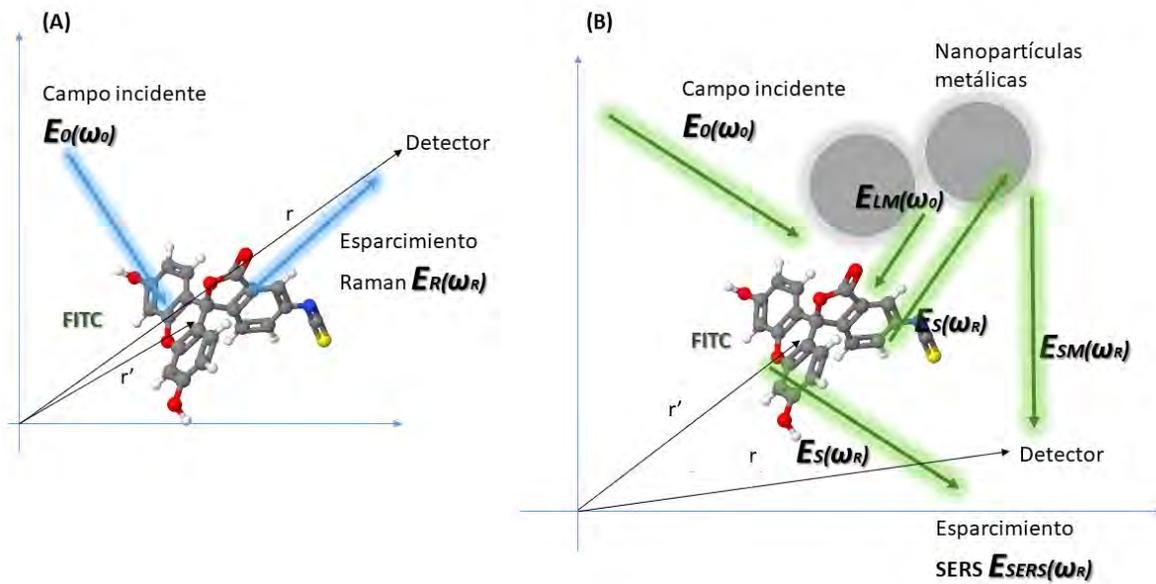


Figura 6. Esquema que describe (A) El esparcimiento Raman en ausencia de nanopartículas metálicas y (B) El esparcimiento SERS mejorado por nanopartículas metálicas.

Intensificación del campo electromagnético incidente sobre la molécula: la intensidad del campo que incide sobre la molécula ubicada en la posición r' está compuesta por la intensidad del campo E_0 de la radiación láser a frecuencia ω_0 y por la del campo de Lorentz-Mie E_{LM} esparcido por el metal a la misma frecuencia ω_0 (efecto de resonancia plasmónica). Por lo tanto, el campo eléctrico total que incide sobre la molécula en la posición r' será.^{1,2,8}

$$E_T(r', \omega_0) = E_0(r', \omega_0) + E_{LM}(r', \omega_0) \quad (17)$$

En condiciones de resonancia, el campo esparcido E_{LM} por el metal es mayor y la expresión anterior se puede aproximar a:

$$E_T(r', \omega_0) \approx E_{LM}(r', \omega_0) = gE_0(r', \omega_0) \quad (18)$$

Donde g es la amplificación del campo electromagnético por parte de la nanopartícula metálica. Este campo incidente induce en la molécula un momento dipolar $P(r', \omega_0)$ que luego emitirá radiación Raman de frecuencia ω_R . Así, el momento dipolar inducido en la molécula puede ser expresado como.^{5,6,9}

$$P(r', \omega_0) = \alpha_R E_T(r', \omega_0) \quad (19)$$

La radiación Raman esparcida por la molécula genera un campo eléctrico de intensidad E_S que es proporcional a $\alpha_R E_{LM}$.

Intensificación de la Radiación Raman: la radiación Raman de frecuencia ω_R puede ser amplificada por la nanopartícula con un factor de ganancia g' . De este modo el campo eléctrico total esparcido con frecuencia ω_R , que se observa en la posición r (fotodetector), está compuesta por el campo esparcido directamente por la molécula cuya intensidad está relacionada con $E_S(\omega_R)$, y por el campo esparcido por la nanopartícula cuando son excitados los plasmónes $E_{SM}(\omega_R)$, como se esquematiza en la Fig. 6 (B), de esta manera podemos escribir el campo total esparcido SERS en la posición r como.^{5,6,9}

$$E_{SERS}(r, \omega_R) = E_S(r, \omega_R) + E_{SM}(r, \omega_R) \quad (20)$$

El cual en condiciones de resonancia plasmónica puede ser escrito como:

$$E_{SERS} \approx E_{SM} \approx g'E_S \approx g'\alpha_R E_{LM} \approx gg'\alpha_R E_0 \quad (21)$$

Y la intensidad SERS:

$$I_{SERS} \approx |gg'|^2 \alpha_R^2 I_0 \quad (22)$$

Donde I_0 es la intensidad del campo incidente E_0 . Cuando la diferencia entre ω_R y ω_0 es mínima, el valor de g se puede aproximar a g' y la intensidad SERS será amplificada con un factor proporcional a la cuarta potencia de la amplificación del campo cercano local incidente. De esta manera, se puede definir un factor de intensificación G .^{1,2}

$$G = \frac{I_{SERS}}{I_{Raman}} = \left| \frac{\alpha_R}{\alpha_{R0}} \right|^2 |g|^4 \quad (23)$$

Donde I_{Raman} es el valor de la intensidad del campo eléctrico esparcido inelásticamente en ausencia de nanopartículas metálicas y α_{R0} la polarizabilidad Raman en ausencia de

nanopartículas metálicas.^{1,2} El valor de G depende de la morfología de la nanopartícula metálica, la distancia a la posición r , la constante dieléctrica del metal ϵ y de la constante dieléctrica del medio que lo rodea ϵ_r . El modelo electromagnético predice un factor de intensificación de la señal Raman del orden de 10^6 , que coincide con algunos valores de G obtenidos experimentalmente. El gradiente formado por el campo electromagnético existente sobre la superficie de las nanopartículas metálicas, hace que los modos vibracionales relacionados con grupos funcionales del analito que se encuentran más cercanos a los hot spots producidos, presenten una mayor intensidad SERS con respecto a los grupos más alejados de estas zonas de alta mejora. Este efecto de la proximidad puede ser utilizado para conocer el mecanismo mediante el cual se produce la interacción entre el adsorbato y el metal.^{1,2,10}

Las reglas de selección en el efecto SERS son ligeramente diferentes a las que se presentan en la espectroscopia Raman original. Estas reglas afectan los modos vibracionales permitidos en Raman, de tal forma que se pueden diferenciar los modos más activos de los menos activos. En las proximidades de la nanopartícula metálica donde ocurre el efecto SERS, las intensidades del campo polarizado paralela y perpendicularmente a la superficie metálica, no tienen los mismos valores, lo cual permite determinar la orientación de la molécula sobre la superficie, ya que los modos vibracionales perpendiculares a la superficie se ven más intensificados que aquellos que se encuentran en dirección paralela.^{1,2}

1.3.2. El efecto de la adsorción molecular.

El mejoramiento químico está relacionado con la modificación del tensor de polarizabilidad Raman cuando la molécula es adsorbida sobre la superficie del metal. Este cambio podría

generar tanto un enfriamiento como una mejora de la señal. Sin embargo, la situación más relevante se presenta cuando la polarizabilidad modificada entra en resonancia con la excitación, debido a un mecanismo de transferencia de carga en el complejo metal-adsorbato. La adsorción molecular se puede presentar por quimisorción si la molécula se une químicamente al metal, por ejemplo mediante enlaces covalentes, o por fisisorción si hay unión a través de atracciones electrostáticas.^{1,2,8} La nube electrónica del adsorbato representada por la polarizabilidad α puede distorsionarse por la interacción con la superficie sólida de la nanoestructura. Cuando la energía de esta interacción llamada entalpía de adsorción es mayor a -25 kJ mol^{-1} aproximadamente, la interacción se clasifica como fisisorción, mientras que cuando la entalpía de adsorción es mucho menor que -40 kJ mol^{-1} se clasifica como quimisorción.^{1,2,8} La quimisorción impone un cambio drástico en α de moléculas pequeñas, haciendo que la polarizabilidad α se convierta en la de una nueva molécula o complejo de superficie, con diferente espectro vibratorio y nuevos estados electrónicos.^{1,9} La fisisorción también puede causar una distorsión en la polarizabilidad α y en consecuencia alterar a sus primeras derivadas, lo que generaría un patrón de intensidades relativas diferente para el espectro SERS de las especies fisisorbidas en comparación con las de la molécula en ausencia del metal.^{2,7} Como vemos, el problema de la adsorción molecular es difícil de abordar. Por un lado, los mecanismos de adsorción de la mayoría de las moléculas aún no se conocen bien, puesto que son muy difíciles de estudiar experimentalmente bajo las condiciones necesarias para SERS. Por otra parte, muchos parámetros afectan las propiedades de adsorción, no solo dependen del conjunto metal-molécula, sino también de la concentración del analito, ya que la señal puede verse afectada por la presencia de otras especies en la preparación del sustrato.^{1,2,8} Para ilustrar lo dicho

anteriormente, podemos considerar una molécula cargada negativamente en una solución coloidal de (Ag) cargada negativamente. La repulsión electrostática evita cualquier unión a la superficie metálica y no se observa ninguna respuesta en la señal de SERS. Si ahora secamos una gota de una solución de la misma molécula sobre un substrato SERS plano de (Ag), entonces la molécula probablemente quedará en la superficie al secarse y es probable que se observe una señal de SERS mejorada. Para soluciones coloidales con carga estabilizada, se pueden usar consideraciones electrostáticas simples como una primera aproximación al problema. Cuando se agrega un analito a una solución coloidal de (Ag) u (Au), se supone que está cargado negativamente, como ocurre en la mayoría de los casos, inicialmente el problema es de naturaleza electrostática, ya que las especies moleculares cargadas negativamente se repelen electrostáticamente con la superficie coloidal y es poco probable que se adsorban. Por el contrario, las moléculas cargadas positivamente son atraídas a la superficie, donde pueden quimisorberse o fisisorberse eficientemente a través de enlaces electrostáticos. Las especies neutras también pueden unirse de manera efectiva a los coloides, siempre y cuando tengan uno de los muchos grupos funcionales apropiados para la unión química a los metales.^{1,2,8} Pueden considerarse tres casos particulares en los que ocurre adsorción molecular.

Caso I: se presenta cuando el adsorbato no se une covalentemente al metal. En este caso, la presencia del metal actúa solo como una perturbación de la estructura electrónica del analito, causando un pequeño cambio en su distribución electrónica y generando un cambio de la eficiencia Raman del modo.^{1,8}

Caso II: como se puede observar en la Fig. 7 este caso implica la presencia de un complejo de superficie ya sea por unión covalente al metal, o por unión indirecta con la ayuda de un ion electrolítico. Esto puede producir un cambio sustancial en la polarizabilidad intrínseca de la molécula, generando nuevas transiciones indirectas proporcionadas por la superposición de los orbitales moleculares que brindan un canal para modificar la polarizabilidad. También es posible que el complejo de superficie cree un nuevo estado electrónico que entra en resonancia o cerca de resonancia con el láser, por lo cual contribuye a la mejora por medio de una resonancia tipo Raman.^{1,2,8}

Caso III: implica un proceso de transferencia de carga fotoinducida entre el analito y el metal. Esta situación puede ocurrir cuando el láser iguala la diferencia entre el nivel de Fermi (EF) del metal y las energías HOMO (orbital molecular más alto ocupado) o LUMO (Orbital molecular más bajo vacío) como se observa en la Fig. 7, el cual puede activar un mecanismo de transferencia de carga fotoinducido entre el HOMO y los estados desocupados por encima del (EF) o entre el LUMO y los estados ocupados ligeramente por debajo del (EF).^{1,2,57} Este tipo de mejoramiento se descubrió a través de experimentos en células electroquímicas, donde es posible cambiar la diferencia de energía entre el analito adsorbido y el metal a través de un potencial externo.^{1,2,8} La intensidad máxima de SERS se observa a diferentes potenciales para diferentes energías láser incidentes, lo cual implica que se necesitan diferentes condiciones de sintonización dependiendo de la energía láser utilizada, y esta sintonización es proporcionada por el potencial externo. Estos experimentos demuestran que los mejoramientos por transferencia de carga entre las moléculas y los sustratos efectivamente ocurren y desempeñan un papel importante en la magnitud de la mejora de SERS.^{1,8} La adsorción molecular es muy difícil de controlar en general, pero al menos debe

tenerse en cuenta al interpretar algunos experimentos SERS o las consecuencias que se puedan derivar de ellos.^{1,2} Algunas diferencias entre los dos procesos de mejoramiento de la señal SERS se resumen en la Tabla 3.

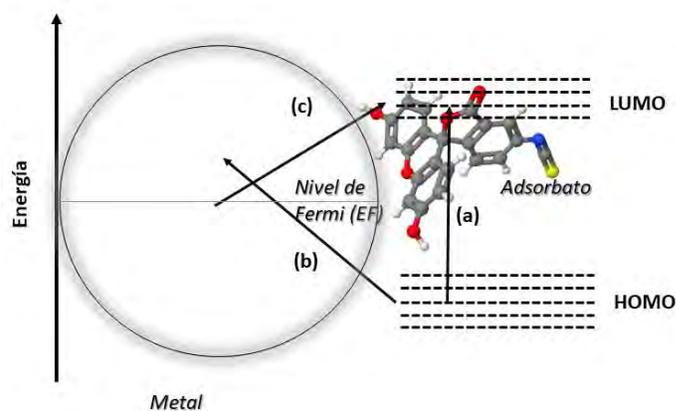


Figura 7. Representación esquemática del mejoramiento de transferencia de carga a través del HOMO-LUMO. (Caso (a)) La energía del láser puede entrar en resonancia con una transición electrónica del complejo metal-molécula. (Caso (b) + (c)) puede producirse una mejora gracias a un acoplamiento indirecto (transferencia de carga) a través del metal.

Tabla 3. Diferencias a considerar entre el mejoramiento electromagnético (EM) y el mejoramiento de transferencia de carga (TC).

Parámetros	Mejoramiento (EM)	Mejoramiento (TC)
Radiación incidente.	El mejoramiento (EM) depende de la función dieléctrica $\epsilon(\omega)$ que a su vez es dependiente de la longitud de onda.	Los procesos de resonancia dependen de la longitud de onda.
Potencial eléctrico aplicado.	Puede cambiar la morfología superficial del metal.	Puede modular las energías de transición (TC)
Radio de acción.	Es efectivo incluso para moléculas que están alejadas de la superficie del metal. Largo alcance.	Es efectivo únicamente en las moléculas adsorbidas sobre la superficie del metal. Corto alcance.
Morfología de la superficie metálica.	Rugosidad superficial entre 10nm y 200nm	Rugosidad a escala atómica.
Fenómenos asociados.	Plasmónes de superficie localizados.	Complejo metal-molécula.

1.4. Substratos plasmónicos para espectroscopia SERS

Un sustrato SERS generalmente se puede definir como un soporte que contiene nanoestructuras metálicas, las cuales producen el mejoramiento SERS. Estos pueden ser

clasificados en tres clases principales: partículas metálicas, generalmente usadas en soluciones coloidales,^{5,6,9} estructuras metálicas planas o 3D, las cuales constan de un conjunto de nanopartículas metálicas incrustadas en un sustrato plano o 3D que puede ser de vidrio, silicio, metales, etc,¹ y electrodos metálicos, los cuales permitieron observar por primera vez el fenómeno SERS, en este tipo de sustratos la mejora SERS depende del potencial aplicado sobre el electrodo.^{1,2} Las soluciones de coloides metálicos, generalmente de (Ag) y (Au), son los más utilizados en la espectroscopia SERS, debido a que son relativamente fáciles de producir en el laboratorio.^{1,8} Nuestros sustratos SERS 3D utilizan nanopartículas metálicas preparadas in situ sobre una plataforma de nanocelulosa bacteriana.

1.5. Nanocelulosa bacteriana como plataforma SERS

La nanocelulosa bacteriana (BC) es producida por una bacteria no patógena conocida como (*Acetobacter xylinum*). En el proceso de cultivo las bacterias se van multiplicando hasta alcanzar una especie de tejido de este nanomaterial. El resultado es una película de nanocelulosa con nanofibras del orden de 50 nm de diámetro, la cual no tiene impurezas y además posee una alta cristalinidad.^{58,59} La nanocelulosa ha atraído la mirada de diferentes campos de estudio como son la biomedicina, ingeniería, biomateriales y dispositivos optoelectrónicos, entre otros, gracias a que cuenta con una gran variedad de propiedades fisicoquímicas. Recientemente se han realizado estudios de biosensado utilizando plataformas de nanocelulosa, dopadas con nanopartículas metálicas para ser analizadas en SERS.^{58,59} Morales-Narváez E. *et. al*, han reportado mejoramientos en la señal de (R6G) sobre sustratos SERS basados en nanocelulosa bacteriana, aprovechando las propiedades

que brinda este material,⁶⁰ en la Fig. 8 se puede apreciar el uso de la (BC) en la elaboración de substratos SERS.

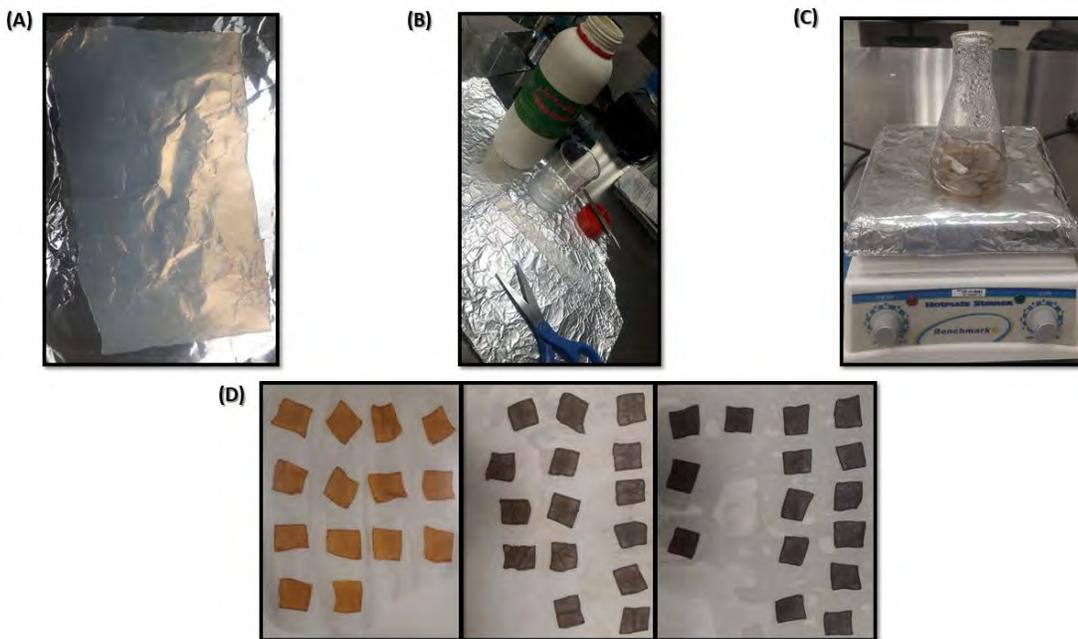


Figura 8. *Nanocelulosa Bacteriana. (A) Sobre una lámina de aluminio. (B) Cortada en tiras para la elaboración de substratos SERS. (C) En el proceso de preparación in situ de nanopartículas de (Ag), (Au) y (GO). (D) En el proceso de secado de los substratos SERS.*

1.6. Grafeno y su relación con SERS

Desde la década de 1920 se han realizado diversos estudios sobre el grafeno, definiéndolo como una lámina de carbono infinita bidimensional en una red hexagonal.⁶¹ En el año 2004 fue posible obtener una lámina de grafeno extrayéndola del grafito, lo que atrajo la atención en los campos de la física, la química, la ciencia de los materiales y las aplicaciones en dispositivos optoelectrónicos.^{61,62} Por esta contribución, el Premio Nobel de Física 2010 fue

otorgado a Andre Geim y Konstantin Novoselov.^{61,62} El grafeno se ha convertido en un material bastante atractivo para la ciencia en general y para la nanotecnología de vanguardia. El grafito y el diamante son los alótropos de carbono más frecuentes. El primero es un material en capas conductor de electricidad que consiste en una pila de láminas de grafeno, mientras que el segundo es una red tetraédrica tridimensional con propiedades aislantes.⁶¹ Las propiedades altamente conductoras del grafito se originan a partir de electrones π deslocalizados en toda la red hexagonal de grafeno construida con el orbital híbrido sp^2 del estado σ como se puede observar en la Fig. 9, en contraste con las propiedades aislantes del diamante construido con el orbital híbrido sp^3 , estas hibridaciones del carbono se esquematizan en la Fig 10.

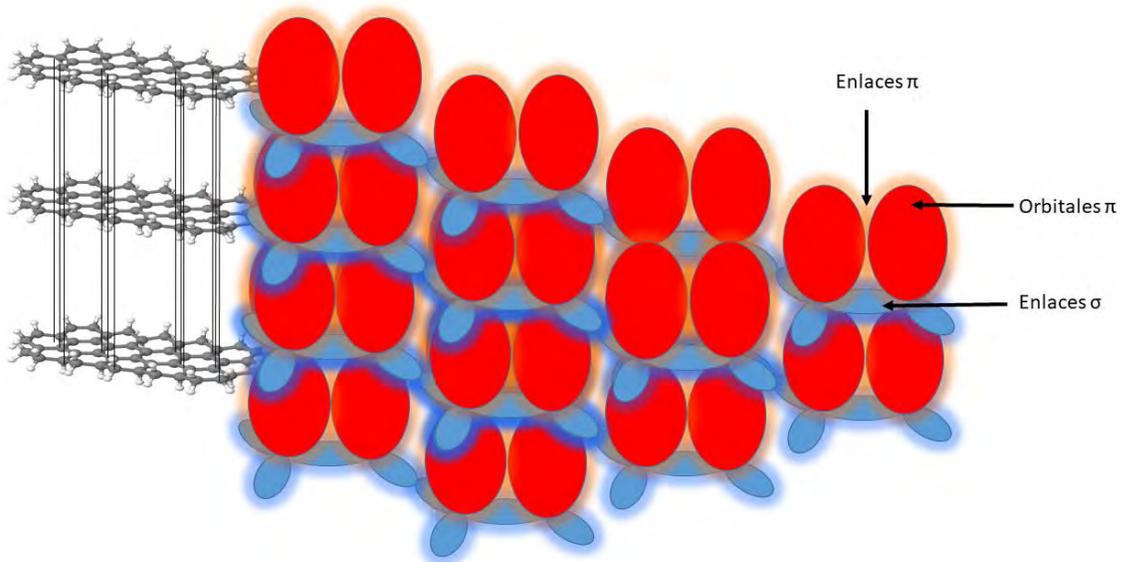


Figura 9. Estructura del grafito dependiente de los enlaces y orbitales σ y π .

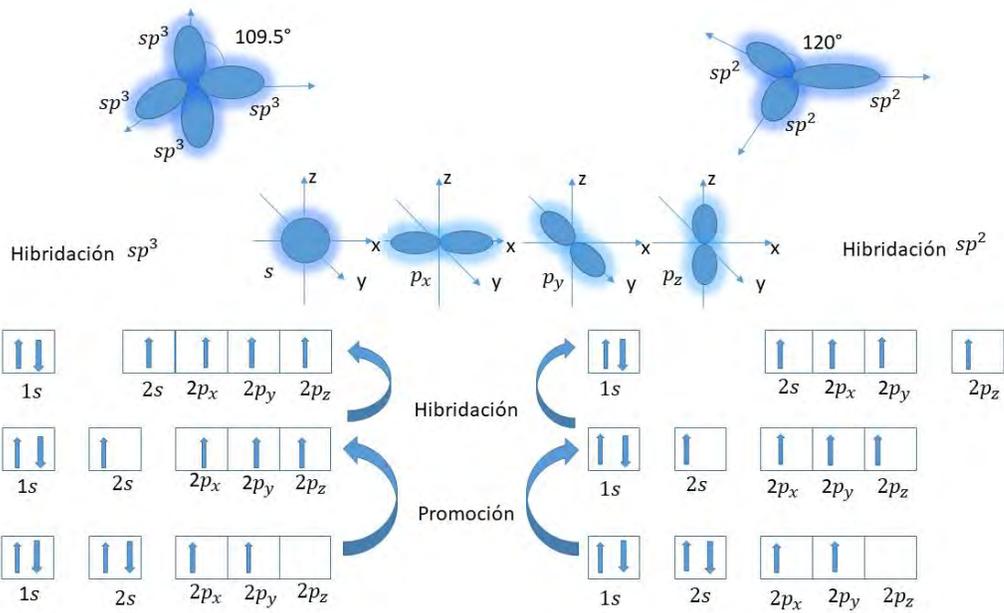


Figura 10. Hibridaciones sp^2 y sp^3 del carbono desde la teoría de orbitales moleculares. Partimos de la configuración electrónica del carbono, el cual al unirse a otros elementos por enlaces covalentes, produce una promoción de un electrón del orbital s al orbital p , la mezcla de orbitales moleculares se conoce como hibridación.

Desde el punto de vista geométrico, los bordes en zigzag menos aromáticos tienen estados de electrones π no unidos llamados estados de borde, los cuales juegan un papel importante en las actividades electrónicas y químicas del grafeno.^{61,62} El grafeno es la unidad fundamental a partir de la cual se pueden construir compuestos de intercalación de grafito, fullerenos y nanotubos de carbono.^{61,62} El Grafeno y sus derivados también han tenido éxito en numerosas aplicaciones tales como dispositivos biológicos, nanomedicina, biomedicina, biosensores, etc.⁶² Un material de óxido de grafito a granel consta de una acumulación de hojuelas de grafeno oxidado (GO), que pueden ser exfoliadas fácilmente en una sola capa de (GO) por diferentes métodos, como por ejemplo el ultrasonido. Los diversos grupos funcionales oxigenados en superficies de (GO), desempeñan papeles muy importantes y

cruciales dentro de las investigaciones de las propiedades de (GO) y su bioaplicación.^{61,62} El control de la oxidación del grafeno, proporciona una forma de sintonizar sus propiedades electrónicas, ópticas y mecánicas, propiedades muy atractivas en la fabricación de substratos SERS. El oxigenado de grupos funcionales aumenta con el incremento de la oxidación y sus propiedades eléctricas se vuelven más pobres en comparación con el (GO) altamente reducido, en la Fig. 9 se esquematizan el grafito, el grafeno, el grafeno oxidado (GO) y el grafeno oxidado reducido (rGO), que se usan como potenciales substratos en aplicaciones SERS.^{57,63-67}

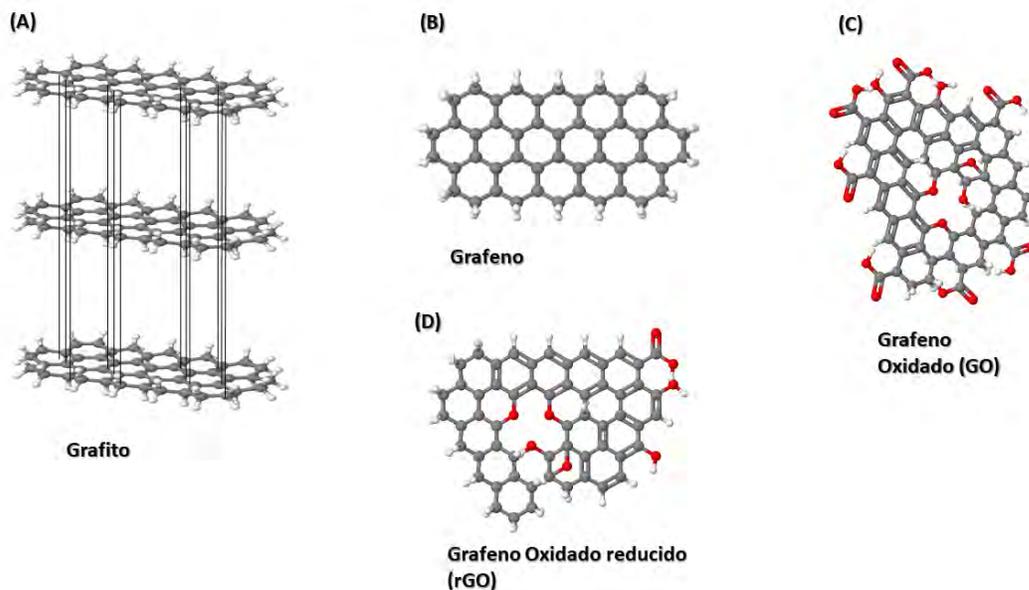


Figura 11. Esquematización del Grafito y sus derivados. **(A) Grafito:** el cual consta de una acumulación de capas de grafeno. **(B) Grafeno:** Red hexagonal de átomos de carbono con bordes de enlaces π deslocalizados. **(C) Grafeno Oxidado (GO):** el cual contiene abundantes grupos funcionales oxigenados. **(D) Grafeno Oxidado reducido (rGO):** el cual contiene menos grupos funcionales que el (GO).

El grafeno no se puede considerar como un substrato SERS hecho de materiales plasmónicos, ya que no contribuye al mejoramiento electromagnético. Sin embargo, se le

puede considerar dentro del mejoramiento químico. El mejoramiento del esparcimiento Raman por grafeno generalmente se conoce como (GERS) por sus siglas en inglés. Se ha estudiado el efecto GERS para el grafeno en diferentes formas, en las cuales se incluyen (GO), puntos cuánticos de grafeno, bordes de grafeno y grafeno en malla. Todas estas estructuras de grafeno contienen defectos, por ejemplo, el (GO) puede contener grupos funcionales que modifican su estado electrónico, permitiendo una mejora en las señales Raman, ya que el estado electrónico es un factor crítico en el mejoramiento químico.^{52,57} Debido a la complejidad del mejoramiento químico, no se ha encontrado un modelo universal para describir la respuesta GERS dependiente de la estructura del grafeno, ya que para este tipo de relaciones hay que tener en cuenta las propiedades intrínsecas de la molécula de sonda, la distancia molécula-grafeno, variación de la banda de energía, dopaje, propiedades de adsorción, así como las condiciones de excitación.^{57,62} Según el modelo de transferencia de carga de contribución química en SERS, la mejora también puede considerarse como un efecto de resonancia modificado, debido a la formación de estados de transferencia de carga relacionados con el nivel de Fermi del metal. Del mismo modo, para una mejora considerable de GERS, se requiere una coincidencia energética entre los niveles de energía de las moléculas de sonda HOMO, LUMO y el nivel de Fermi del grafeno.^{57,62} Para el caso del grafeno, interpretado como un semimetal con un intervalo de banda cero, su nivel de Fermi se puede modular agregando un voltaje de puerta positivo o negativo. Además de la modulación del nivel de Fermi del sustrato, la mejora del GERS basada en el mecanismo de transferencia de carga, también puede ser modulada por la energía del láser incidente, se ha demostrado que la mejora de GERS es sensible a la distancia molécula-grafeno, orientación molecular, niveles de energía electrónica tanto del grafeno como de las

moléculas, y las condiciones de radiación incidente. Todas estas son características comunes consistentes con la mejora química en metales nobles.⁵⁷

Recientemente se han reportado diversos estudios sobre substratos SERS que involucran (GO), estos estudios han demostrado la dependencia del grado de oxidación del grafeno y del número de capas de (GO), así como también hay dependencia de defectos, bordes y mallas que involucran efectos térmicos y eléctricos.^{36,39,45,57}

1.7. Caracterización de un substrato SERS

La caracterización de los substratos SERS nos permite hacer una primera aproximación sobre la comprensión de las señales SERS en los substratos fabricados, para ello utilizamos la microscopía electrónica de barrido (SEM) o microscopía de fuerza atómica (AFM) y la espectroscopia UV-Vis.^{1,2}

1.7.1. Determinación de las características geométricas de las nanopartículas.

Las características geométricas de las nanopartículas metálicas en un substrato SERS, desempeñan un papel decisivo en las propiedades plasmónicas relacionadas con la mejora (EM) que brinda el substrato. La medida más directa de esta estructura se puede realizar mediante el uso de microscopía electrónica.^{1,2,9} La técnica más común es la microscopía SEM que requiere un substrato conductor o la evaporación de una capa metálica delgada, generalmente de platino sobre el substrato. La información detallada del tamaño y la forma se pueden extraer de estas micrografías para la geometría en el plano, complementándose con la microscopía AFM que brinda información más detallada de la altura. Las

microscopías SEM y AFM proporcionan una mirada directa a las formas y tamaños básicos de las nanopartículas producidas, pero consume mucho tiempo y es costoso, por lo cual a menudo se recurre a técnicas ópticas como la espectroscopia UV-Vis, que son suficientes para la caracterización rutinaria de nuevos substratos SERS.^{1,2,11}

1.7.2. Espectro de extinción, una forma de encontrar la longitud de onda de resonancia plasmónica.

Como se ha mencionado anteriormente, la forma más simple de caracterización óptica de substratos SERS es mediante mediciones de extinción óptica directa o espectroscopia UV-Vis, típicamente medida en una configuración de transmisión en substratos SERS planos, con lo cual se busca encontrar de manera aproximada la región plasmónica de los substratos y una estimación del tamaño y forma de las nanopartículas.^{1,2}

Los espectros de extinción UV-Vis muestran picos asociados con una respuesta óptica resonante en la longitud de onda correspondiente a las resonancias de plasmón superficial localizadas del substrato. Este pico puede ampliarse de manera no homogénea, debido a la falta de uniformidad del substrato. La característica más importante que se puede obtener de los espectros de extinción es precisamente esta longitud de onda de resonancia plasmónica. Debido a que el efecto SERS surge como resultado de la interacción con tales resonancias de plasmónes de superficie localizadas, se espera la mayor mejora de SERS cuando el láser incidente coincide con una longitud de onda cercana a la longitud de onda de resonancia.^{1,2} Aunque la conexión que existe entre el espectro de extinción y la magnitud de las mejoras

electromagnéticas en SERS se presenta por medio de las resonancias asociadas a los plasmónes superficiales en nanopartículas metálicas, no ocurre lo mismo para las frecuencias resonantes asociadas a los huecos, las cuales no son más intensas en el espectro de extinción, a pesar de sus mejoras de campo local mucho más grandes. En casos donde la señal de SERS está dominada por un pequeño número de regiones de alta mejora (hot spots), el espectro de extinción puede ser un mal indicador de donde ocurren las mejoras máximas de SERS.^{1,5,6}

El espectro de extinción puede ser una herramienta muy útil para comprobar las predicciones teóricas sobre las propiedades de la muestra en consideración. Sin embargo, en ocasiones es difícil hacer coincidir los experimentos con la teoría, ya que una variedad de combinaciones de tamaño, forma y polidispersidad, pueden presentar espectros muy similares. Incluso si hay información estructural disponible, la posición de la resonancia de una sola partícula puede ser relativamente insensible al tamaño de las partículas cuando nos referimos a tamaños pequeños. De hecho, siempre que la aproximación electrostática sea una buena descripción de las propiedades ópticas de una partícula metálica, la posición de resonancia es independiente del tamaño pero no de la forma. Con respecto a la determinación de la forma, se ha llevado a cabo una serie de experimentos para correlacionar el tamaño y la forma de nanopartículas de (Ag) individuales con sus características de resonancia de plasmón. En todos los casos, la comparación con la teoría es usada como una verificación de consistencia, en lugar de una herramienta realmente predictiva de la estructura. Las mediciones de extinción son buenas mediciones de control de calidad para comparar diferentes lotes de muestras, pero no son confiables para la estimación de las propiedades geométricas del metal.^{1,2,10}

Capítulo 2. Desarrollo experimental

2.1. Materiales

Todos los reactivos empleados en este experimento fueron de grado analítico y se manejaron de acuerdo con sus hojas de datos.

- ✓ Se compraron Hidróxido de sodio (NaOH), Nitrato de plata (AgNO_3), Clorhidrato de dicloruro de oro (HAuCl_3), e Isotiocianato de fluoresceína (FITC) de Sigma-Aldrich (Toluca, México, México).

- ✓ El nano papel de celulosa bacteriana (BC) se adquirió de Nano Novin Polymer Co. (Mazandaran, Irán).

- ✓ Se obtuvo agua ultrapura (resistividad $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) a través de un sistema Milli-Q, Direct-Q 3UV (Millipore Co., Burlington, MA, EE. UU.).

- ✓ La dispersión de óxido de grafeno (5 mg mL^{-1}), tamaño lateral $\approx 500\text{nm}$, razón carbono/oxígeno ≈ 1 , se obtuvo de Angstrom Materials, Inc. (Dayton, OH, EE. UU.).

- ✓ La solución de perlas de sílice fundida no funcionalizada en agua desionizada, $02.06 \mu\text{m}$, 2 g mL^{-1} se obtuvo de Bangs Laboratories, Inc. P/N SS04N/9857.

2.2. Instrumentación

- ✓ **Espectroscopia UV-Vis:** Se usó espectroscopia de extinción UV-Vis para analizar la extinción (absorbancia y esparcimiento) de las muestras sólidas estudiadas. Todos los substratos sintetizados se cortaron en círculos de 6 mm de diámetro usando herramientas de perforación las cuales se muestran en la Fig. 12 (A). Los espectros de extinción UV-Vis se registraron utilizando un espectrofotómetro Cytation 5, BioTek (Winooski, Vermont, EE. UU.) que aparece en la Fig. 12 (B).

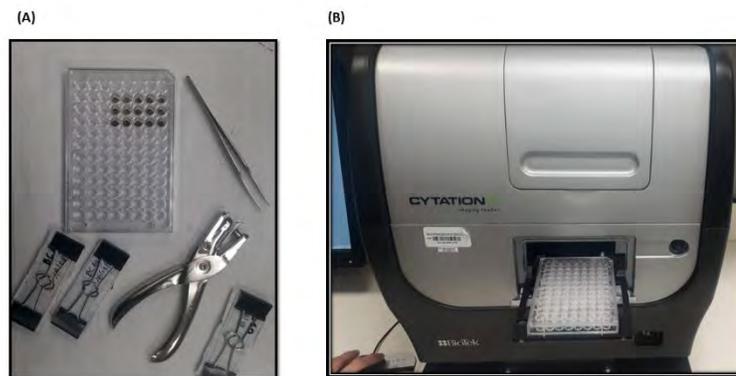


Figura 12. (A) Fotografía de las herramientas de perforación y de los substratos preparados para analizar su espectro de extinción. (B) Fotografía del equipo Cytation 5.

- ✓ **Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos x por dispersión en energía (EDS):** Se tomaron micrografías SEM de los substratos fabricados para determinar la morfología y distribución de las nanopartículas metálicas en los substratos, acompañado de un análisis químico en EDS para determinar la cantidad de porcentaje en peso de los elementos presentes en los substratos. Estas medidas se realizaron en un microscopio SEM modelo JSM-7800F de Jeol que se esquematiza en la Fig. 13. Las muestras a analizar en el microscopio SEM fueron colocadas sobre una cinta de carbono, cubriendo los bordes con un esmalte metálico de plata.

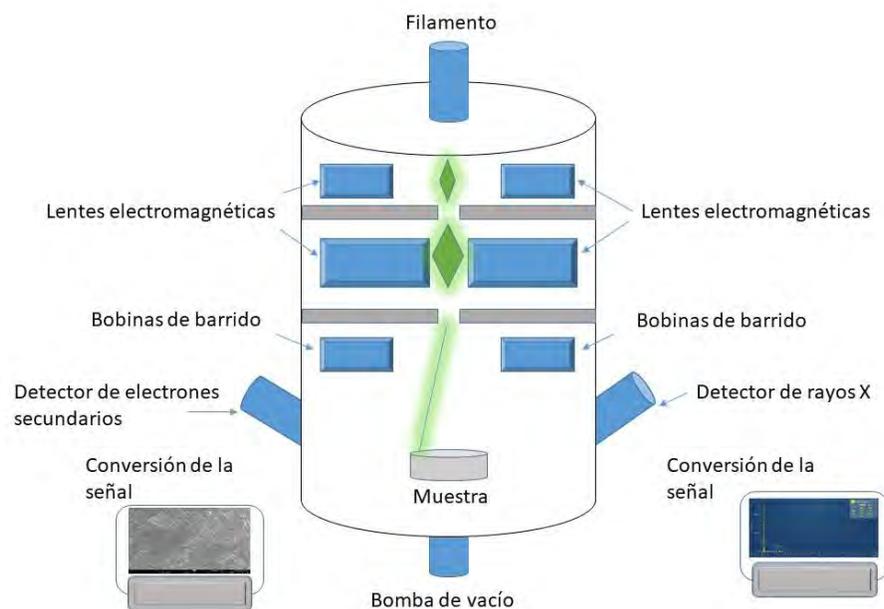


Figura 13. Esquema del microscopio electrónico de barrido (SEM).

- ✓ **Espectroscopia Raman y análisis SERS:** Los espectros Raman y SERS se adquirieron utilizando un módulo Renishaw inVia Raman para análisis espectroscópico (Wotton-under-Edge, Reino Unido), que se acopla con un microscopio Leica DM 2500M en configuración vertical como se puede apreciar en la Fig. 14. Se empleó una lente objetivo de 50X, apertura numérica ($NA = 0,75$) en todos los experimentos. La línea de excitación roja fue proporcionada por un láser de diodo centrado en $\lambda = 785$ nm (1% de potencia). Las líneas de excitación azul $\lambda = 457$ nm y verde $\lambda = 514$ nm fueron proporcionadas por un láser de argón (1% de potencia), tiempo de exposición: 1s, acumulaciones: 10, se obtuvieron 10 espectros para cada substrato en áreas aleatorias y se graficaron los promedios. Todos los substratos SERS se analizaron una vez que se secaron completamente, luego de haber sido incubados con la molécula analito (FITC), mayores detalles sobre los componentes del equipo se pueden apreciar en el esquema de la Fig. 15.

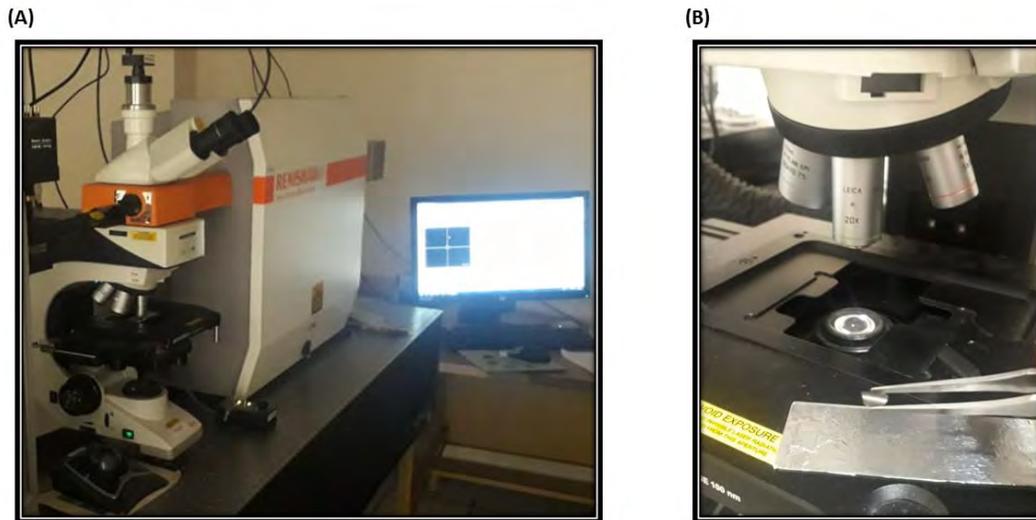


Figura 14. (A) *Fotografía del espectrómetro Renishaw.* (B) *Fotografía de un sustrato SERS llevado al microscopio.*

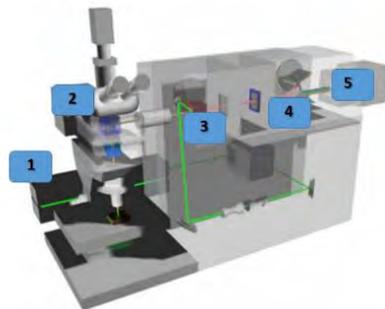


Figura 15. *Componentes de un espectrómetro Raman. 1) Fuente de luz monocromática (láser). El espectrómetro está equipado con dos láseres, un láser diodo centrado en 785 nm y otro láser de argón con líneas de excitación 514 nm y 457 nm. 2) Sistema de iluminación de la muestra que recolecta la luz esparcida (microscopio). 3) Medio para filtrar toda la luz excepto la que experimenta esparcimiento Raman (Filtros holográficos Notch o filtros dieléctricos). 4) Rejilla de difracción para dividir la luz esparcida en diferentes longitudes de onda. 5) Fotodetector para medir la luz esparcida (cámara CCD).*

2.3. Métodos

Síntesis de los substratos estudiados: Para cada tipo de substrato se emplearon 15 piezas de nanocelulosa (BC) húmeda, de dimensiones (2,5 cm x 2,5 cm), previamente sometidas a enjuagues (3 veces durante 10 min con agua Milli-Q, a temperatura de 65°C y agitación constante 300 rpm). La preparación de los substratos en ausencia y presencia de (GO) se esquematiza en la Fig. 16.

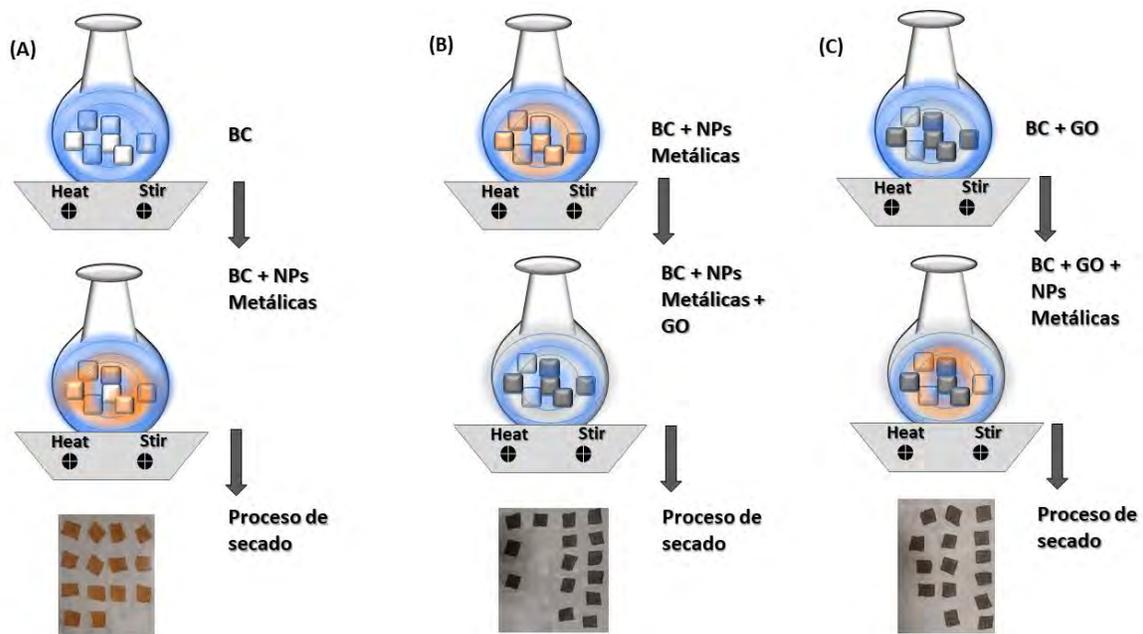


Figura 16. Esquema que describe el proceso de preparación de los substratos SERS fabricados en el laboratorio. **(A)** Substratos que contienen (NPs) metálicas. **(B)** Substratos a los que primero se agregaron (NPs) metálicas y luego (GO). **(C)** Substratos a los que primero se agregó (GO) y luego (NPs) metálicas.

➤ **Substratos S1 (BC/AuNPs/AgNPs):**



En un matraz con 50 mL de agua ultrapura, se agregaron 15 piezas de BC, para ser llevadas a un calentador y agitador magnético ajustando la temperatura a 65°C y agitación constante

de 300 rpm, posteriormente se agregaron diferentes volúmenes de HAuCl_3 a concentración $10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ como se muestra en la Tabla 4. Se dejó en calentamiento y agitación constante por 15 minutos, luego se llevaron las piezas a otro matraz con 50 mL de agua ultrapura y se ajustó el $\text{pH} = 12$ usando 3 mL de NaOH 2 M, manteniendo una temperatura controlada de 65°C , se agregaron 7 mL de AgNO_3 a concentración $8.9 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ y se dejó en calentamiento y agitación constante por 20 minutos. Finalmente, las piezas se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente en ausencia de luz.

➤ **Substratos S2 (BC/AuNPs/AgNPs/GO):**



En un matraz con 50 mL de agua ultrapura, se agregaron 15 piezas de BC, para ser llevadas a un calentador y agitador magnético ajustando la temperatura a 65°C y agitación constante de 300 rpm, posteriormente se agregaron volúmenes de (800 μL y 1000 μL) de HAuCl_3 a concentración $10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ como se muestra en la Tabla 4. Se dejó en calentamiento y agitación constante por 15 min, luego se llevaron las piezas a otro matraz con 50 mL de agua ultrapura y se ajustó el $\text{pH} = 12$ usando 3 mL de NaOH 2 M, manteniendo una temperatura controlada de 65°C , se agregaron 8.75 mL de AgNO_3 a concentración $8.9 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ como se muestra en la Tabla 4 y se dejó en calentamiento y agitación constante por 2 h. Luego se preparó una suspensión de (GO) a $35 \mu\text{g mL}^{-1}$. En otro recipiente se agregaron 49.65 mL de agua ultrapura y 0.35 mL de (GO), posteriormente se agregaron las piezas dopadas con (NPs) de (Ag) y (Au) y se dejó en agitación constante y temperatura de 90°C durante 2 h. Finalmente, las piezas se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente en ausencia de luz.

➤ **Substratos S3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs):**



Inicialmente se preparó una suspensión de (GO) a $35 \mu\text{g mL}^{-1}$. En un recipiente se agregaron 49.65 mL de agua ultrapura y 0.35 mL de (GO), posteriormente se agregaron 15 piezas de BC, para ser llevadas a un calentador y agitador magnético ajustando la temperatura a 90°C y agitación constante de 300 rpm durante 2 h. Después se agregaron volúmenes de (800 μL

y 1000 μL) de HAuCl_3 a concentración $10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ como se muestra en la Tabla 4. Luego se dejó en calentamiento y agitación constante por 15 min, después se llevaron las piezas a otro matraz con 50 mL de agua ultrapura y se ajustó el $\text{pH} = 12$ usando 3 mL de NaOH 2 M, manteniendo una temperatura controlada de 65°C , luego se agregaron volúmenes de (7 mL y 8.75 mL) de AgNO_3 a concentración $8.9 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ como se muestra en la Tabla 4 y se dejó en calentamiento y agitación constante por 2 h. Finalmente, las piezas se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente en ausencia de luz

➤ **Substratos S4 (BC/AgNPs):**



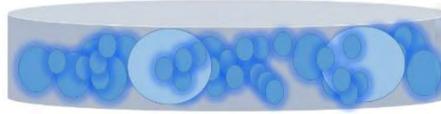
En un matraz con 50 mL de agua ultrapura, se agregaron 15 piezas de BC, para ser llevadas a un calentador y agitador magnético ajustando la temperatura a 65°C y agitación constante de 300 rpm, luego se agregaron 1.6 mL de NaOH 2 M para mantener un $\text{pH} = 12$, posteriormente se agregaron 8.75 mL de AgNO_3 a concentración $8.9 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ como se muestra en la Tabla 4 y se dejó en calentamiento y agitación constante durante 2 h. Finalmente, las piezas se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente en ausencia de luz.

➤ **Substratos S5 (BC/GO/AgNPs):**



Se preparó una suspensión de (GO) a $35 \mu\text{g mL}^{-1}$. En un recipiente se agregaron 49.65 mL de agua ultrapura y 0.35 mL de (GO), posteriormente se agregaron 15 piezas de BC, para ser llevadas a un calentador y agitador magnético ajustando la temperatura a 90°C y agitación constante de 300 rpm durante 2 h. Luego se llevaron las piezas a otro matraz con 50 mL de agua ultrapura y se ajustó el $\text{pH} = 12$ usando 2 mL de NaOH 2 M, manteniendo una temperatura controlada de 65°C , después se agregaron 8.75 mL de AgNO_3 a concentración $8.9 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ como se muestra en la Tabla 4 y se dejó en calentamiento y agitación constante por 2 h. Finalmente, las piezas se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente en ausencia de luz.

➤ **Substratos S6 (BC/Si/AgNPs):**



En un matraz con 50 ml de agua ultrapura, se agregaron 15 piezas de BC, para ser llevadas a un calentador y agitador magnético ajustando la temperatura a 65°C y agitación constante de 300 rpm, después se agregaron 100 µL de la solución de perlas de sílice, luego se agregaron 1.6 mL de NaOH 2 M para mantener un pH = 12, posteriormente se agregaron 8.75 mL de AgNO₃ a concentración 8.9 x 10⁻³ g mL⁻¹ como se muestra en la Tabla 4 y se dejó en calentamiento y agitación constante durante 2 h. Finalmente, las piezas se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Tabla 4. *Condiciones de los reactivos utilizados para la elaboración de los substratos plasmónicos.*

Tipo de substrato	Volumen de H _{Au} Cl ₃ (μL) a concentración 10 ⁻³ g mL ⁻¹	Volumen de AgNO ₃ (mL) a concentración 8.9 x 10 ⁻³ g mL ⁻¹	Volumen de NaOH (mL) a concentración 2 M	Volumen de GO (mL) a concentración 35 μg mL ⁻¹	Volumen de perlas de sílice (μL) a concentración 2 g mL ⁻¹
S1-1	200	7	3		
S1-2	300	7	3		
S1-3	450	7	3		
S1-4	600	7	3		
S1-5	800	7	3		
S1-6	1000	7	3		
S2-1	800	8.75	3	0.35	
S2-2	1000	8.75	3	0.35	
S3-1	800	7	3	0.35	
S3-2	1000	7	3	0.35	
S3-3	800	8.75	3	0.35	
S3-4	1000	8.75	3	0.35	
S4		8.75	1.6		
S5		8.75	2	0.35	
S6		8.75	1.6		100

Capítulo 3. Análisis de Resultados

3.1. Espectroscopia UV-Vis, EDS y microscopía SEM.

Como se ha mencionado en los fundamentos teóricos de este trabajo, los espectros de extinción (absorción y esparcimiento) de los sustratos SERS, nos brindan información sobre la banda de resonancia plasmónica de los metales presentes en los sustratos, para nanopartículas metálicas con geometrías esféricas, las bandas de resonancia plasmónica se encuentran alrededor de los 460 nm para el caso de la plata, mientras que para el oro están alrededor de los 520 nm.

Los espectros de extinción de los sustratos S1 (BC/AuNPs/AgNPs) que aparecen en la Fig. 17 presentan resonancias plasmónicas más cercanas a la banda de la plata que a la del oro, lo cual indica que hay mayor formación de nanopartículas de plata. De este conjunto de sustratos, se seleccionaron aquellos que presentaron mayores intensidades en la banda de resonancia plasmónica para continuar con el análisis en SEM, EDS y SERS, dichos sustratos son los etiquetados como S1-2, S1-5 y S1-6.

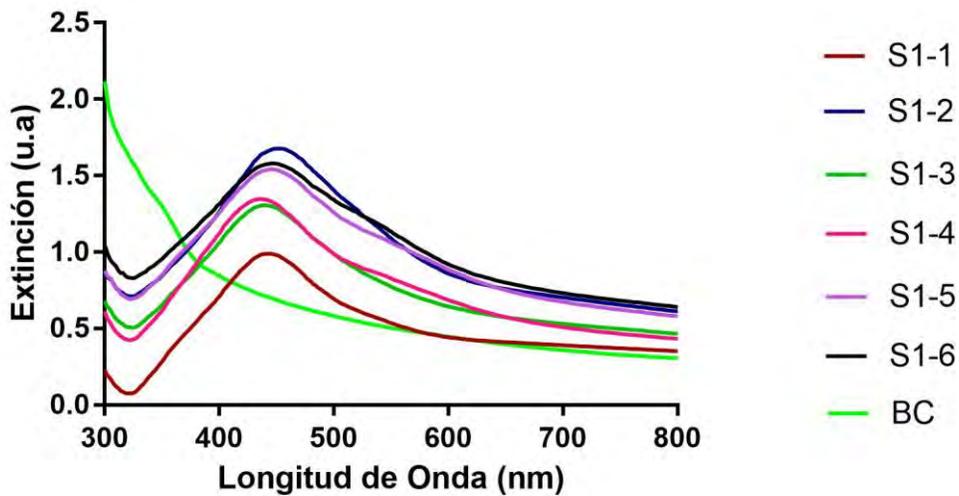


Figura 17. Espectros de extinción UV-Vis de los substratos S1 (BC/AuNPs/AgNPs).

Los espectros de extinción de los substratos S2 (BC/AuNPs/AgNPs/GO) que aparecen en la Fig. 18 presentan bandas de resonancia plasmónica más cercanas a la banda de la plata y los máximos de intensidad son menores en comparación con los obtenidos en los espectros de extinción de los substratos S3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs) que aparece en la Fig. 19, por lo cual fueron descartados para continuar con los experimentos.

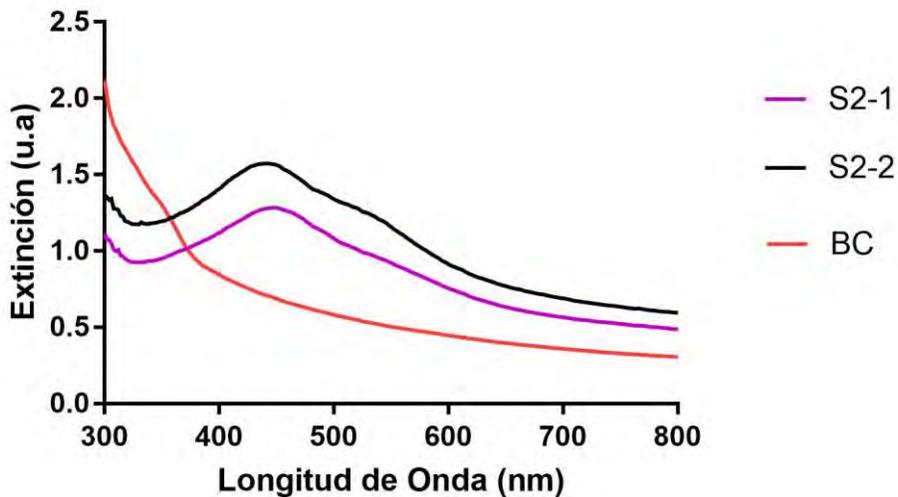


Figura 18. Espectros de extinción UV-Vis de los substratos S2 (BC/AuNPs/AgNPs/GO).

La presencia de GO al iniciar la preparación de los sustratos, permite generar un mayor número de nanopartículas, lo cual se puede ver reflejado en el ancho e intensidad de la banda de extinción de los sustratos S3, de este conjunto se seleccionaron los que presentaron mayores intensidades para continuar con los análisis en SEM, EDS y SERS, estos sustratos corresponden a los etiquetados como S3-1, S3-3 y S3-4.

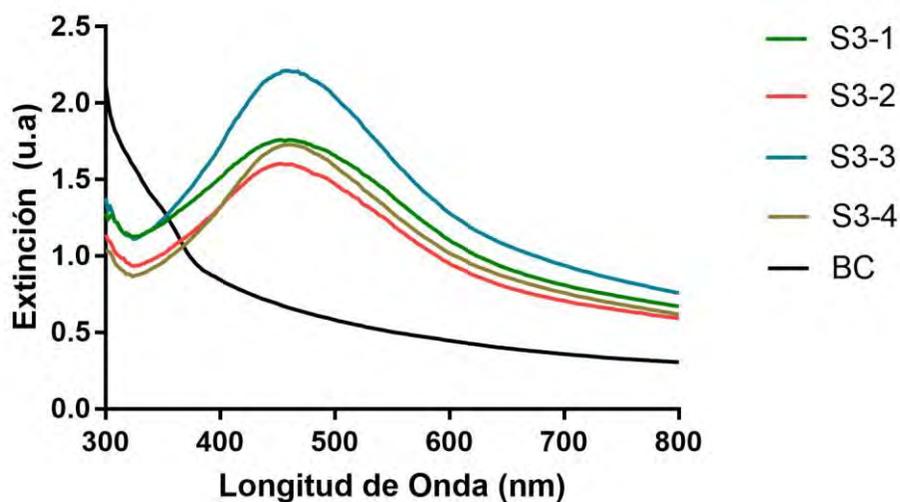


Figura 19. Espectros de extinción UV-Vis de los sustratos S3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs).

Los espectros de extinción de los sustratos S4 (BC/AgNPs), S5 (BC/GO/AgNPs) y S6 (BC/Si/AgNPs) que aparecen en la Fig. 20, presentan bandas de resonancia plasmónica en la región de la plata, la presencia de GO en el sustrato S5 al igual que la presencia de silicio en el sustrato S6 permiten obtener mayores intensidades, por lo cual los sustratos S5 y S6 también fueron seleccionados para analizar en SEM, EDS y SERS.

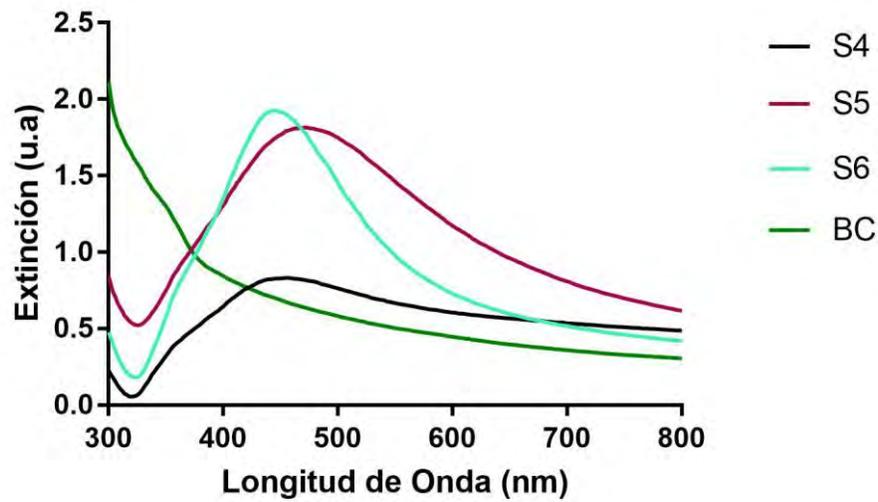


Figura 20. Espectros de extinción UV-Vis de los substratos S4 (BC/AgNPs), S5 (BC/GO/AgNPs) y S6 (BC/Si/AgNPs).

En la Fig. 21, se muestran imágenes SEM de la nanocelulosa bacteriana (BC) que sirvió como plataforma SERS para la fabricación de nuestros substratos plasmónicos, se pueden apreciar las nanofibras que ayudan a contener un mayor número de nanopartículas. En la Fig. 22 se muestra el espectro EDS de la BC, en el cual se puede observar que no hay impurezas en la muestra ya que el porcentaje en peso es 100% Oxígeno.

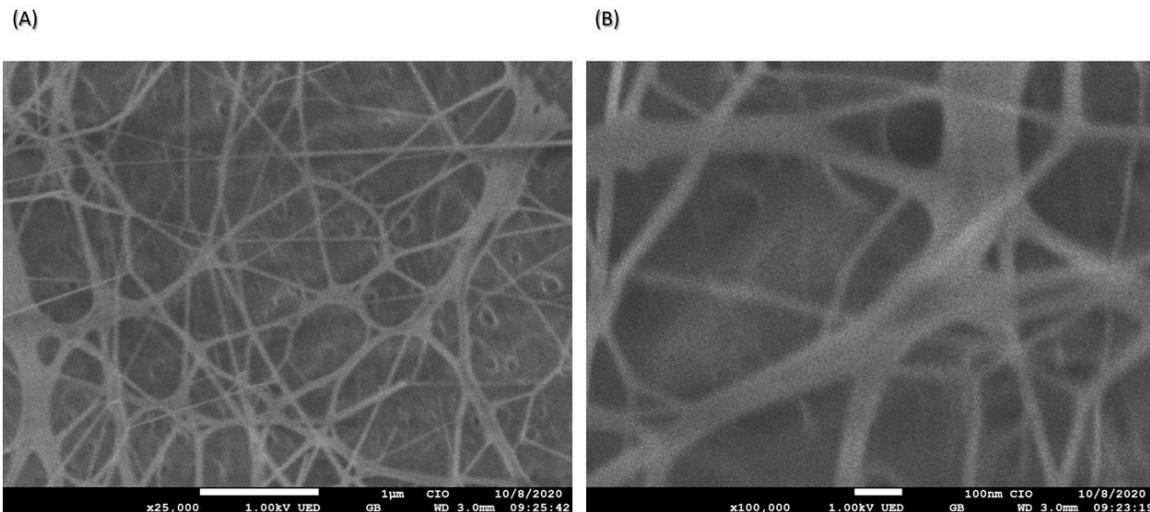


Figura 21. Imágenes SEM de la nanocelulosa bacteriana (BC), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.0 mm. **(A)** Aumento de 25,000X. **(B)** Aumento de 100,000X.



Figura 22. Espectro EDS de la nanocelulosa bacteriana (BC).

En la Fig. 23, se muestran imágenes SEM del sustrato S1-2 (BC/AuNPs/AgNPs) en las cuales se pueden observar la formación de nano-islas y nanopartículas con variedad de tamaños (25 ± 10 nm, Fig. 39) con formas aproximadamente esféricas. El espectro de

extinción del sustrato S1-2 que aparece en la Fig. 24. (A) presenta un máximo de intensidad en $\lambda = 452$ nm cerca de la banda de resonancia plasmónica de la plata, lo cual indica una mayor presencia de plata en el sustrato tal y como se puede verificar con el espectro EDS que aparece en la Fig. 24 (B) ya que la relación de porcentaje en peso es de 2/1 entre la plata y el oro.

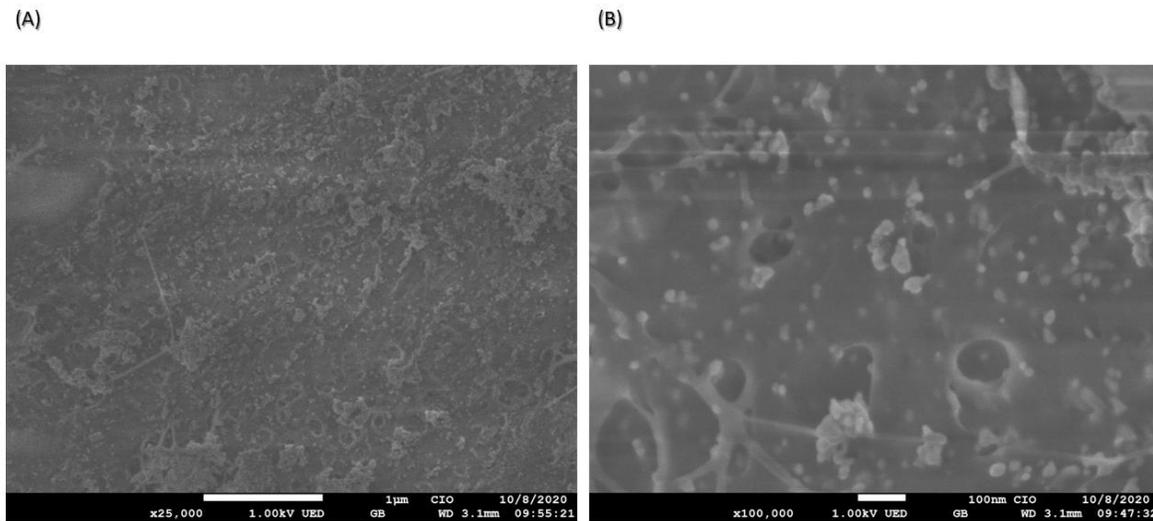


Figura 23. Imágenes SEM del sustrato S1-2 (BC/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.1 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.

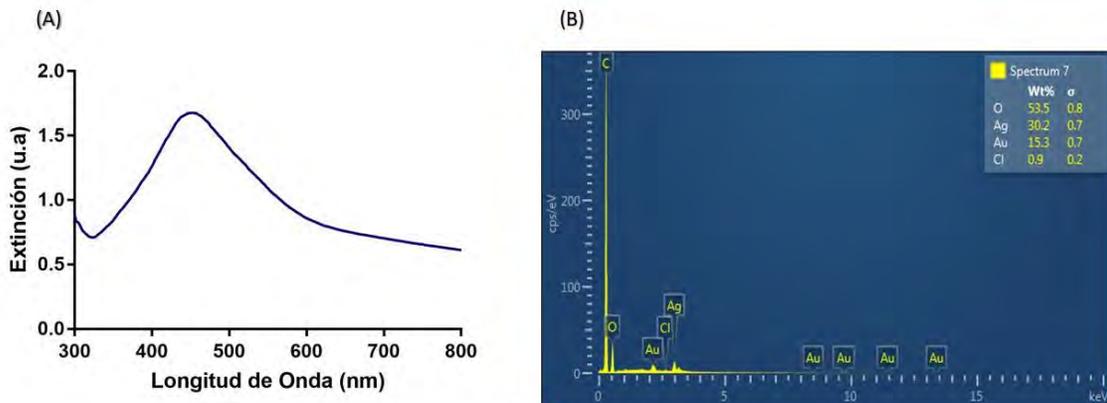


Figura 24. (A) Espectro de extinción del sustrato S1-2 (BC/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S1-2 en el cual se observa una relación de 2 a 1 entre la plata y el oro.

En la Fig. 25, se muestran imágenes SEM del sustrato S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs), en las cuales se puede apreciar la formación de nanopartículas con formas aproximadamente esféricas y diámetros de $(19 \pm 7 \text{ nm})$, Fig. 39). El espectro de extinción del sustrato S1-5 en la Fig 26. (A) presenta un máximo de intensidad en $\lambda = 446 \text{ nm}$ cercano a la banda de resonancia plasmónica de la plata y se verifica con el espectro EDS que se muestra en la Fig. 26 (B), que no hubo formación de nanopartículas de oro, ya que el porcentaje en peso demuestra un 67.3% de plata y 0.2% de oro.

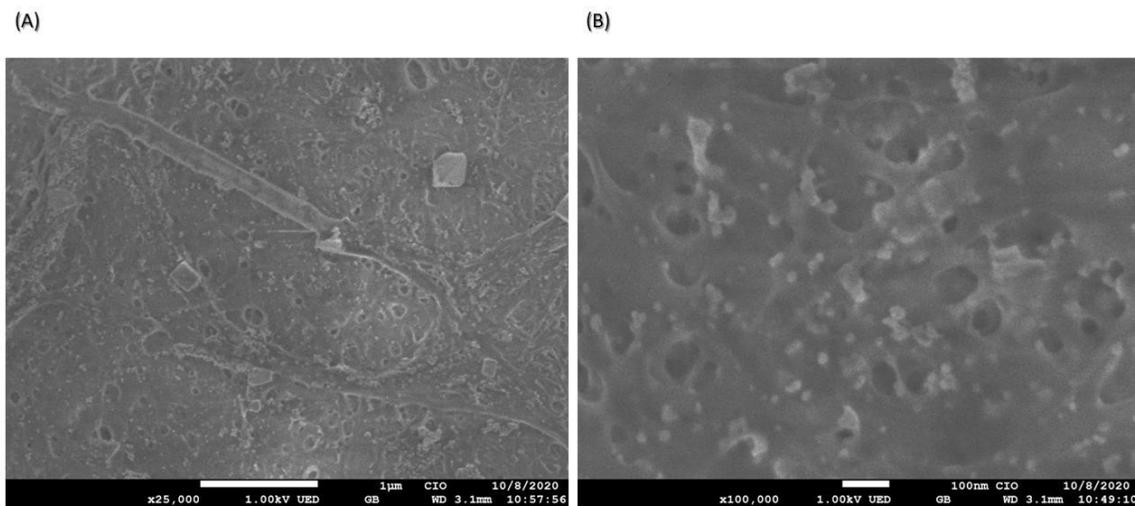


Figura 25. Imágenes SEM del sustrato S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.1 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.

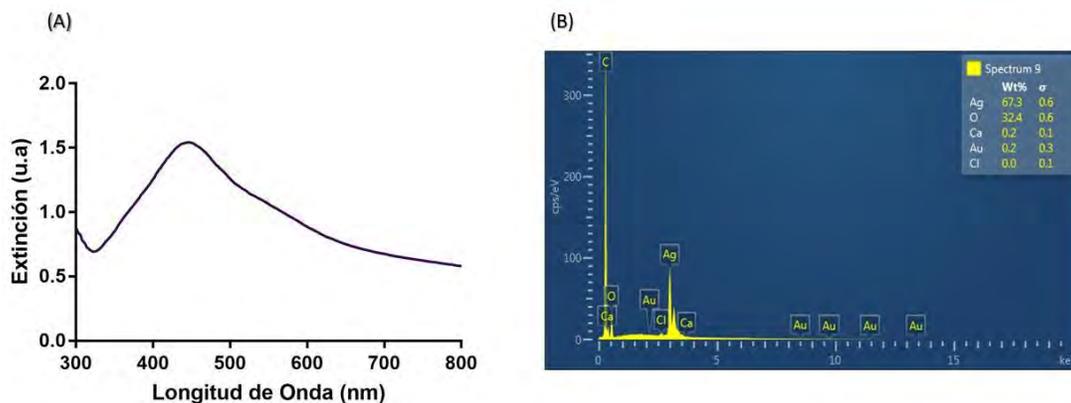


Figura 26. (A) Espectro de extinción del sustrato S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S1-5 en el cual se observa poca presencia de oro y un alto porcentaje en plata.

En la Fig. 27, se muestran imágenes SEM del sustrato S1-6 (BC/AuNPs/AgNPs), donde se puede apreciar la formación de nanopartículas con diámetros de $(18 \pm 8 \text{ nm})$, algunas aglomeradas en las nanofibras de la BC, lugares de alta mejora en SERS. El espectro de extinción en la Fig. 28 (A) y el espectro EDS en la Fig. 28 (B) demuestran que hay mayor presencia de plata que de oro en el sustrato.

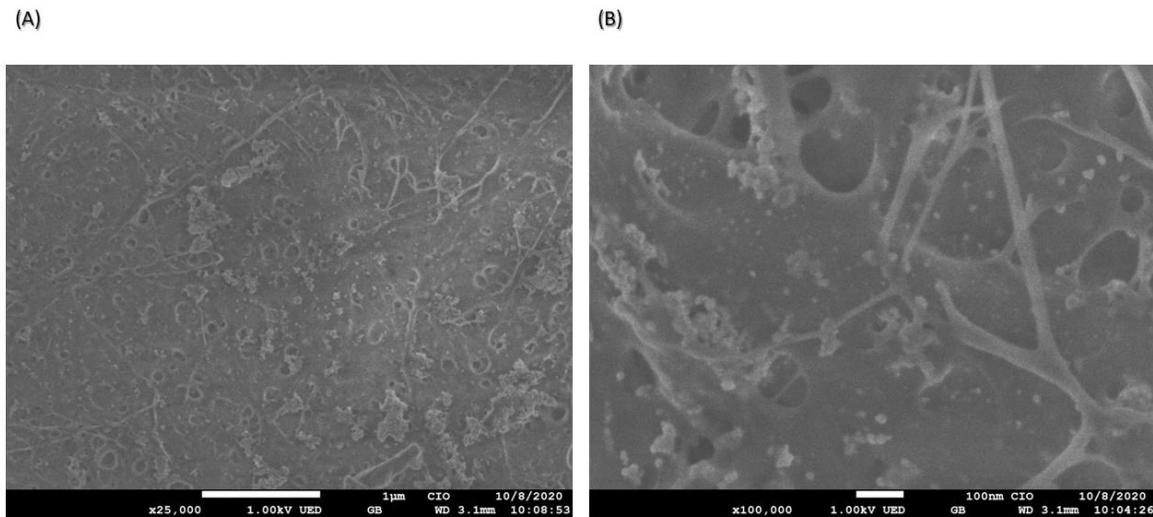


Figura 27. Imágenes SEM del sustrato S1-6 (BC/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.1 mm. **(A)** Aumento de 25,000X. **(B)** Aumento de 100,000X.

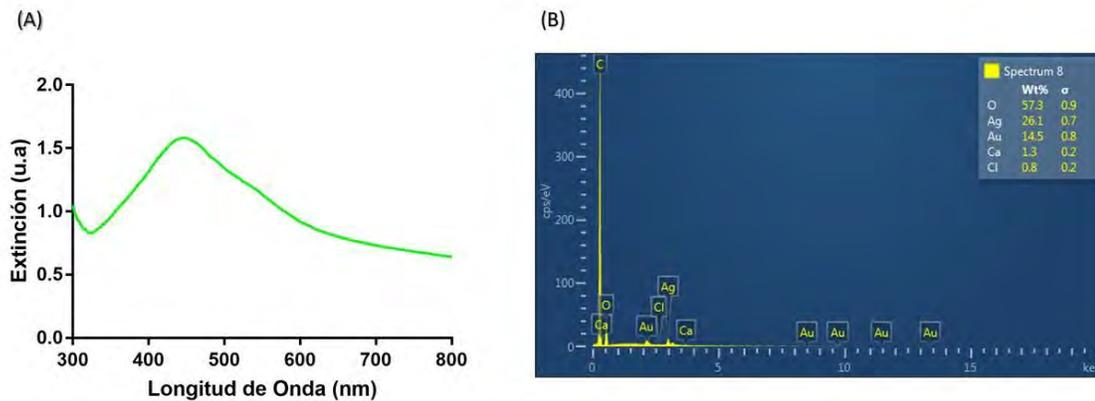


Figura 28. **(A)** Espectro de extinción del sustrato S1-6 (BC/AuNPs/AgNPs). **(B)** Espectro EDS del sustrato S1-6 en el cual se observa una relación de 2 a 1 aproximadamente entre la plata y el oro.

En la Fig. 29, se muestran imágenes SEM del sustrato S3-1 (BC/GO/AuNPs/AgNPs), en las cuales se puede apreciar la formación de nanopartículas con formas aproximadamente esféricas muy cercanas entre sí sobre las hojas de GO, con diámetros de $(23 \pm 10 \text{ nm})$, Fig. Tesis de Maestría Centro de Investigaciones en Óptica | 81

39), la presencia de GO ayuda a generar y concentrar un mayor número de nanopartículas en el sustrato, en los bordes de las hojas de GO se crean nanoestructuras irregulares debido a la inestabilidad de las propiedades eléctricas del GO en esa zona. El espectro de extinción de la Fig. 30 (A) que presenta una banda muy ancha centrada en la región de la plata y el espectro EDS en la Fig. 30 (B) demuestran una mayor presencia de plata que de oro en el sustrato.

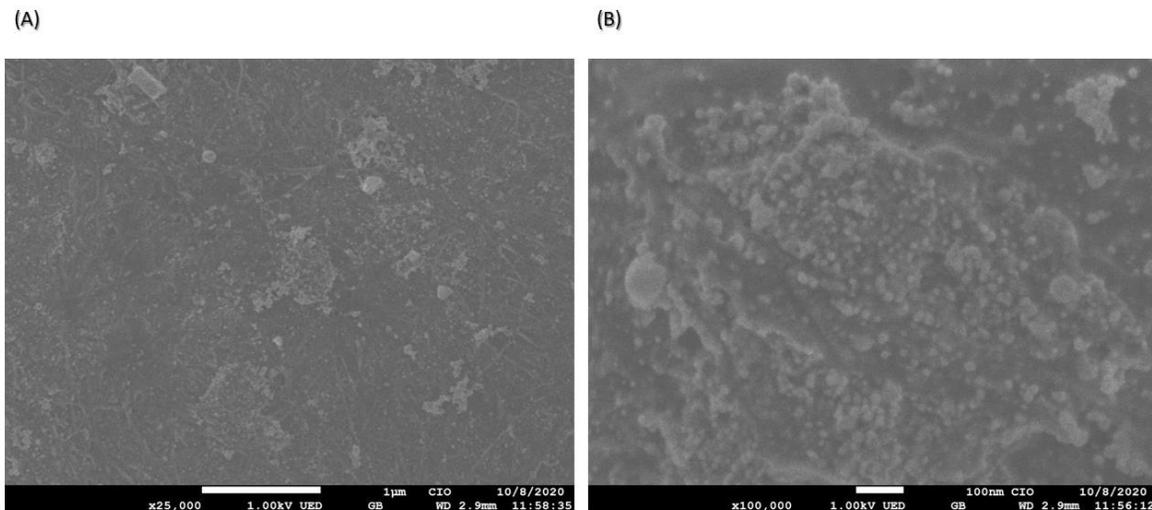


Figura 29. Imágenes SEM del sustrato S3-1 (BC/GO/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 2.9 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.

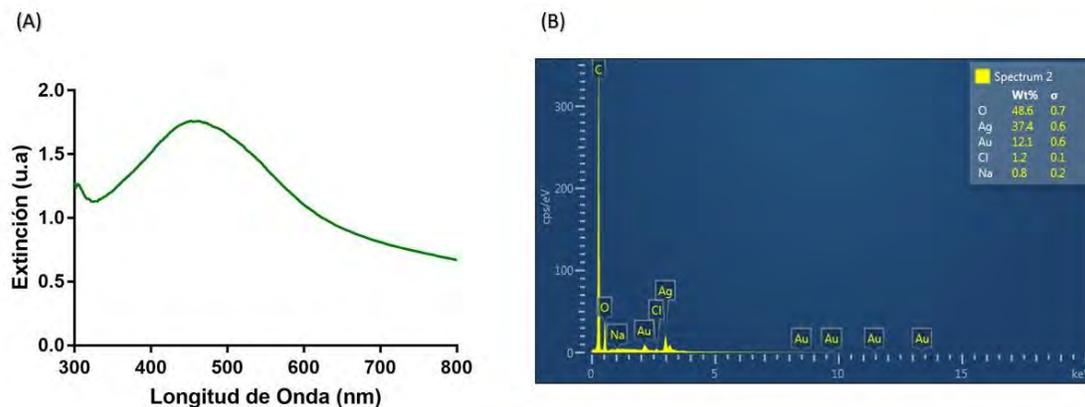


Figura 30. (A) Espectro de extinción del sustrato S3-1 (BC/GO/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S3-1 en el cual se observa una relación de 3 a 1 entre la plata y el oro.

En la Fig. 31, se muestran imágenes SEM del sustrato S3-3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs) en el cual se puede apreciar la formación de nanopartículas en las nanofibras de la BC y en las hojas de GO, con diámetros de $(21 \pm 9 \text{ nm})$, Fig. 39) lo cual indica una mayor presencia de

hot spots. El espectro de extinción en la Fig. 32 (A) y el espectro EDS en la Fig. 32 (B) demuestran mayor presencia de plata que de oro en el sustrato, con una relación de porcentaje en peso de 3/1.

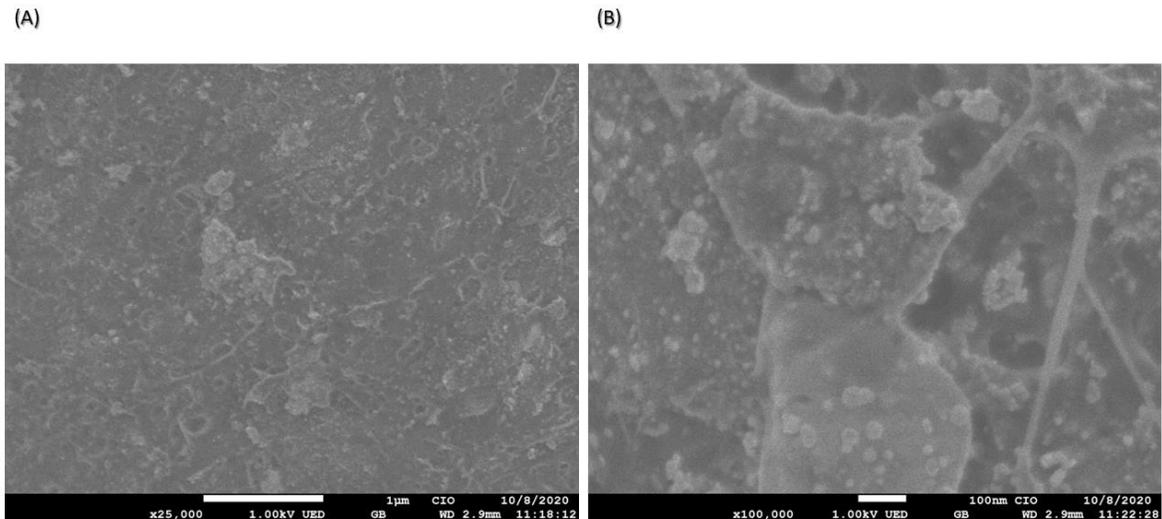


Figura 31. Imágenes SEM del sustrato S3-3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 2.9 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.

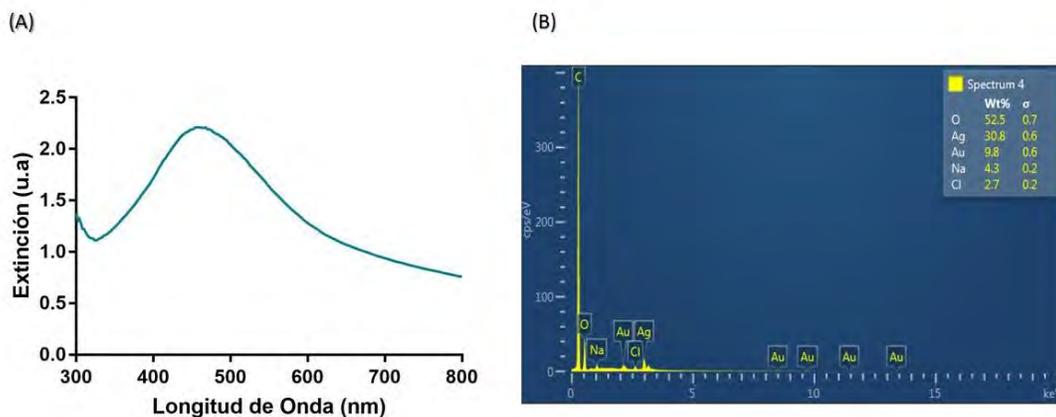


Figura 32. (A) Espectro de extinción del sustrato S3-3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S3-3 en el cual se observa una relación de 3 a 1 entre la plata y el oro.

En la Fig. 33, se muestran imágenes SEM del sustrato S3-4 (BC/GO/AuNPs/AgNPs) en las cuales se pueden apreciar la formación de nanopartículas con formas aproximadamente esféricas, con diámetros de $(25 \pm 13 \text{ nm})$, Fig. 39), también se pueden observar algunos lugares en los cuales hay mayor densidad de nanopartículas gracias a las hojas de GO. El

espectro de extinción en la Fig. 34 (A) y el espectro EDS en la Fig. 34 (B) demuestran mayor presencia de plata que de oro con una relación de porcentaje en peso de 3/1.

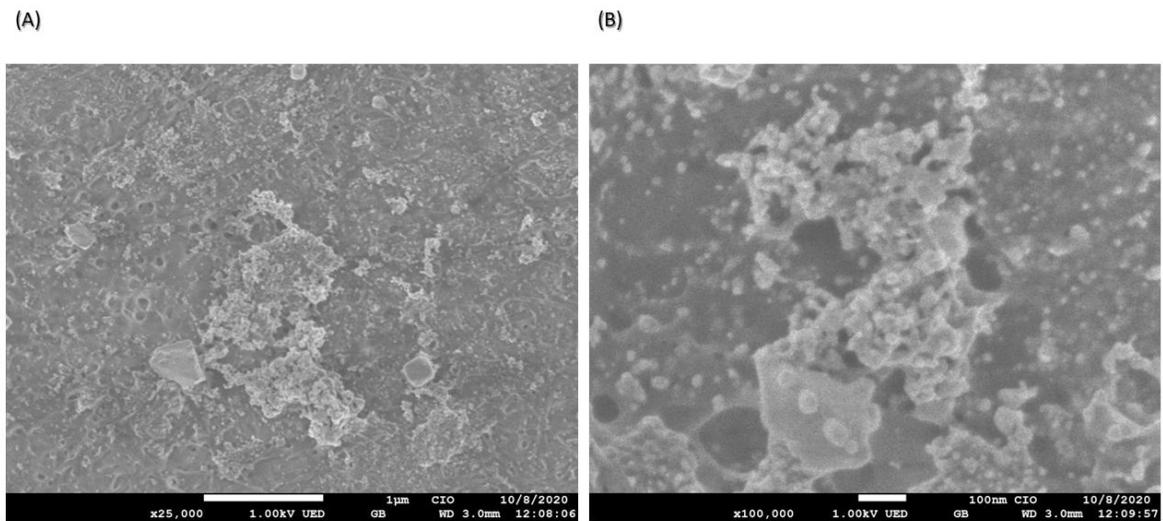


Figura 33. Imágenes SEM del sustrato S3-4 (BC/GO/AuNPs/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.0 mm. **(A)** Aumento de 25,000X. **(B)** Aumento de 100,000X.

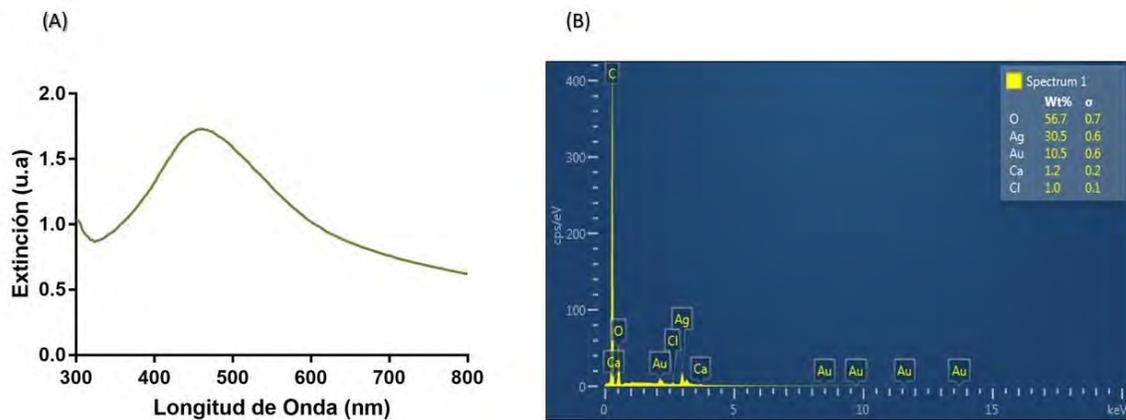


Figura 34. **(A)** Espectro de extinción del sustrato S3-4 (BC/GO/AuNPs/AgNPs). **(B)** Espectro EDS del sustrato S3-4 en el cual se observa una relación de porcentaje en peso de 3 a 1 entre la plata y el oro.

En la Fig. 35, se muestran imágenes SEM del sustrato S5 (BC/GO/AgNPs) en las cuales se pueden apreciar la formación de nanopartículas con formas esféricas más regulares y diámetros de $(35 \pm 11 \text{ nm})$, Fig. 39), las hojas de GO ayudan a concentrar un mayor número

de nanopartículas generando lugares de alta mejora en SERS. El espectro de extinción en la Fig. 36 (A) y el espectro EDS en la Fig. 36 (B) demuestran la presencia de plata en el sustrato.

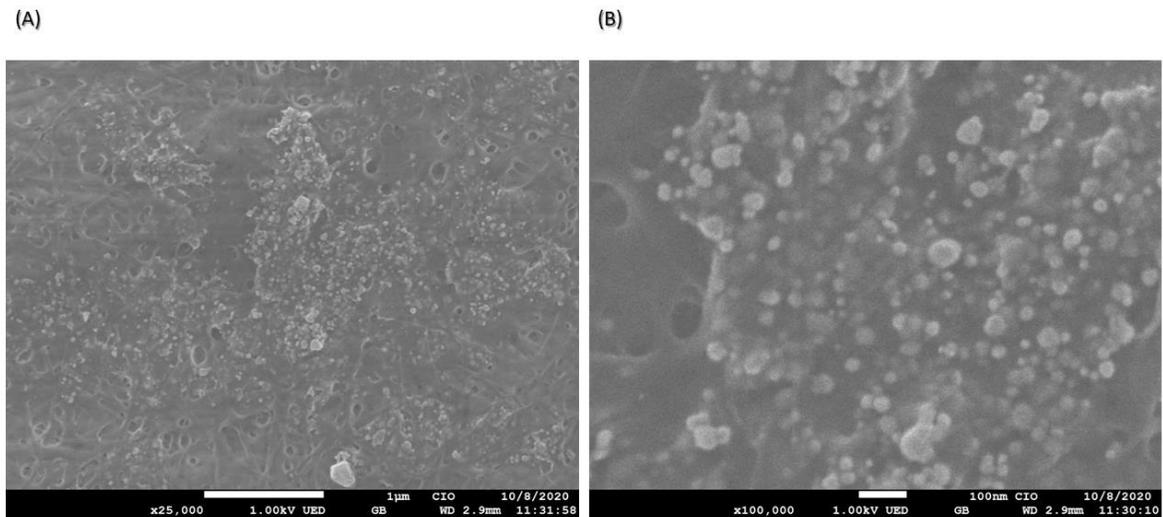


Figura 35. Imágenes SEM del sustrato S5 (BC/GO/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 2.9 mm. **(A)** Aumento de 25,000X. **(B)** Aumento de 100,000X.

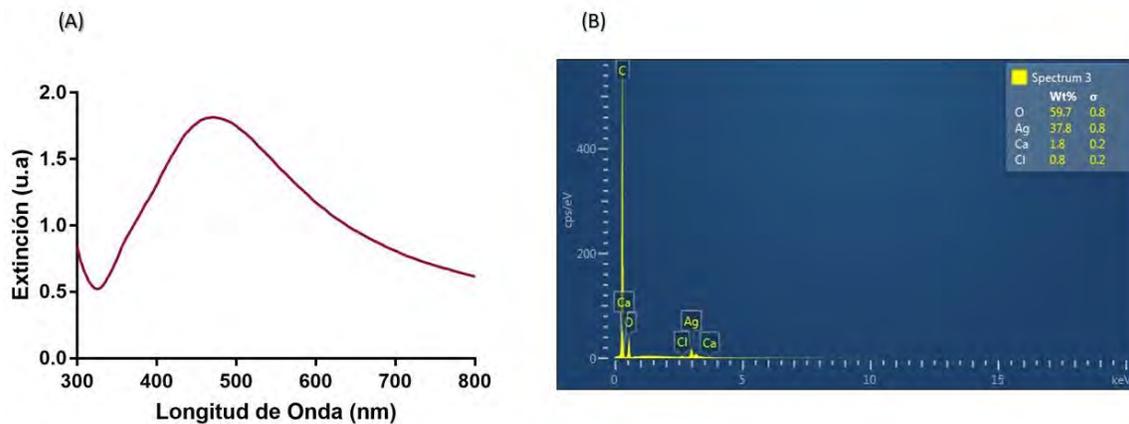


Figura 36. **(A)** Espectro de extinción del sustrato S5 (BC/GO/AgNPs). **(B)** Espectro EDS del sustrato S5 en el cual se observa la presencia de plata.

En la Fig. 37, se muestran imágenes SEM del sustrato S6 (BC/Si/AgNPs) donde se puede apreciar la formación de cúmulos de nanopartículas metálicas muy cercanas entre sí con diámetros de $(42 \pm 21 \text{ nm})$, Fig. 39) también se puede observar una mayor densidad de nanoestructuras en el sustrato, lo cual indica que existen muchos lugares de alta mejora en SERS. El espectro de extinción en la Fig. 38 (A) y el espectro EDS de la Fig. 38 (B) demuestran la presencia de plata y silicio en el sustrato.

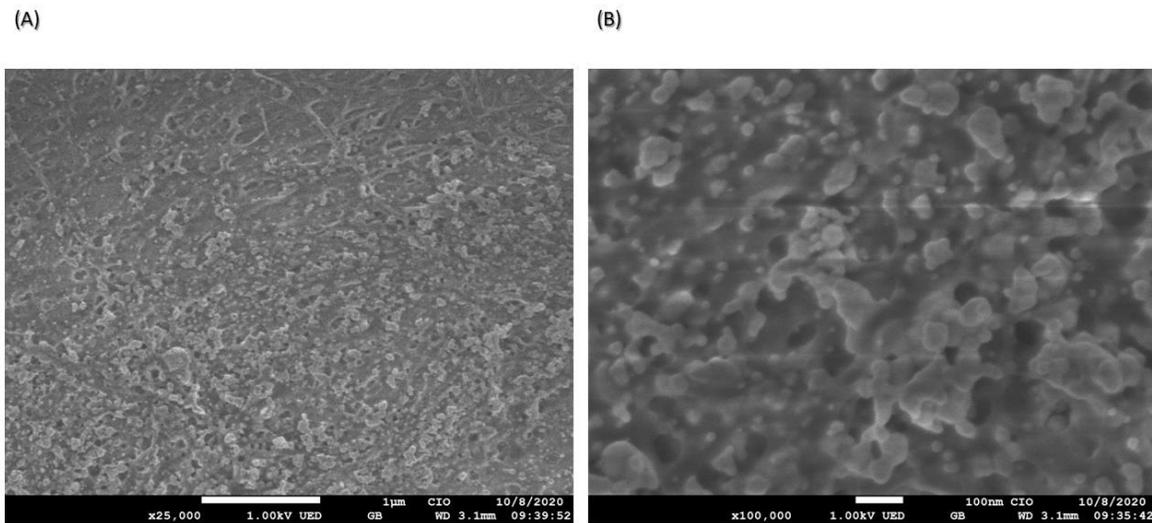


Figura 37. Imágenes SEM del sustrato S6 (BC/Si/AgNPs), configuración UED, voltaje: 1 KeV, distancia de trabajo: 3.1 mm. (A) Aumento de 25,000X. (B) Aumento de 100,000X.

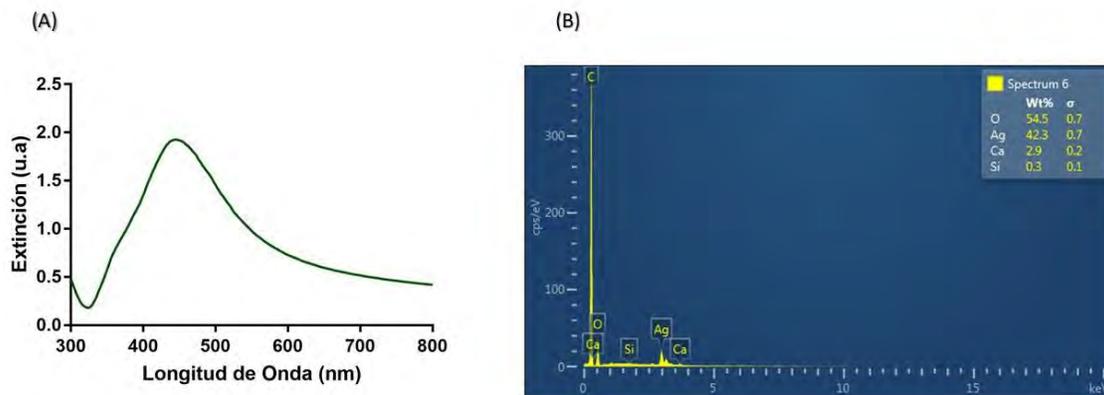


Figura 38. (A) Espectro de extinción del sustrato S6 (BC/Si/AgNPs). (B) Espectro EDS del sustrato S6 en el cual se observa la presencia de plata y un bajo porcentaje de silicio.

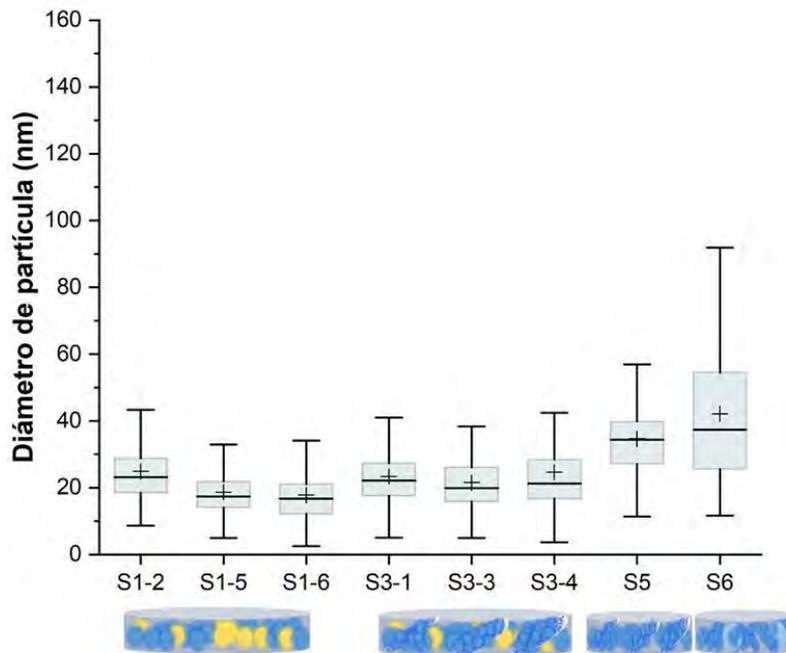


Figura 39. Distribución de tamaños de los substratos fabricados. Los diagramas de caja muestran la mediana, el signo (+) el promedio, los percentiles 25% y 75% y los valores extremos de las distribuciones de tamaño. Debajo de cada substrato aparece un diagrama que lo esquematiza.

En la Tabla 5, se resumen los resultados de la caracterización óptica y química de los substratos analizados en UV-Vis, SEM y EDS.

Tabla 5. Datos de la caracterización óptica y química de los sustratos elaborados.

Tipo de sustrato	% peso (Ag)	% peso (Au)	% peso (Si)	Máximo de extinción (u.a)	Longitud de onda de resonancia plasmónica (nm)	Diámetro de partícula (nm)	Número de partículas por (μm^2)
S1-2 (BC/AuNPs/AgNPs)	30.2 \pm 0.7	15.3 \pm 0.7		1.67 \pm 0.03	452 \pm 2	25 \pm 10	242 \pm 16
S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs)	67.3 \pm 0.6	0.2 \pm 0.3		1.54 \pm 0.08	446 \pm 2	19 \pm 7	279 \pm 10
S1-6 (BC/AuNPs/AgNPs)	26.1 \pm 0.7	14.5 \pm 0.8		1.58 \pm 0.2	448 \pm 2	18 \pm 8	248 \pm 56
S6 (BC/Si/AgNPs)	42.3 \pm 0.7		0.3 \pm 0.1	1.92 \pm 0.13	446 \pm 2	42 \pm 21	598 \pm 31
S3-1 (BC/GO/AuNPs/AgNPs)	37.4 \pm 0.6	12.1 \pm 0.6		1.75 \pm 0.05	460 \pm 2	23 \pm 10	528 \pm 39
S3-3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs)	30.8 \pm 0.6	9.8 \pm 0.6		2.21 \pm 0.06	456 \pm 2	21 \pm 9	506 \pm 18
S3-4 (BC/GO/AuNPs/AgNPs)	30.5 \pm 0.6	10.5 \pm 0.6		1.73 \pm 0.10	460 \pm 2	25 \pm 13	551 \pm 14
S5 (BC/GO/AgNPs)	37.8 \pm 0.8			1.81 \pm 0.03	472 \pm 2	35 \pm 11	572 \pm 16

3.2. Análisis SERS

Para el análisis en SERS se utilizó como molécula analito el Isotiosianato de Fluoresceína (FITC) por sus siglas en inglés, ver Fig. 40 (A) el cual es un fluorocromo derivado de la fluoresceína. Los fluorocromos son moléculas capaces de emitir fluorescencia al ser

excitadas a ciertas longitudes de onda. El espectro de absorción del FITC se muestra en la Fig. 40 (B) y presenta un máximo de intensidad en $\lambda = 521\text{nm}$. Además fue escogido como molécula analito por sus posibles aplicaciones en detección de proteínas sin marcaje, que proporciona evidencia espectroscópica directa asociada con la molécula diana en lugar de la etiqueta.

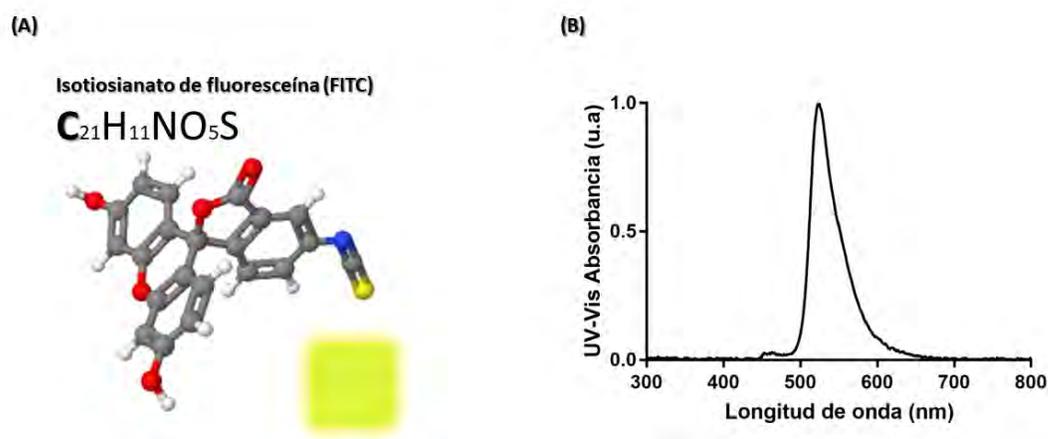


Figura 40. (A) Esquemización de la molécula FITC. (B) Espectro de absorción UV-Vis del FITC.

En la Fig. 41, se muestra el espectro Raman original (sin SERS) del FITC a una concentración de 10^{-3} M, excitado con longitudes de onda $\lambda=457$ nm, $\lambda=514$ nm y $\lambda=785$ nm, en este espectro se pueden observar los efectos de fluorescencia cuando la muestra es irradiada a altas frecuencias (azul y verde), mientras que el espectro obtenido con $\lambda=785\text{nm}$, presenta bandas del FITC bien definidas, cuyas asignaciones a grupos funcionales se muestran en la Tabla 6.

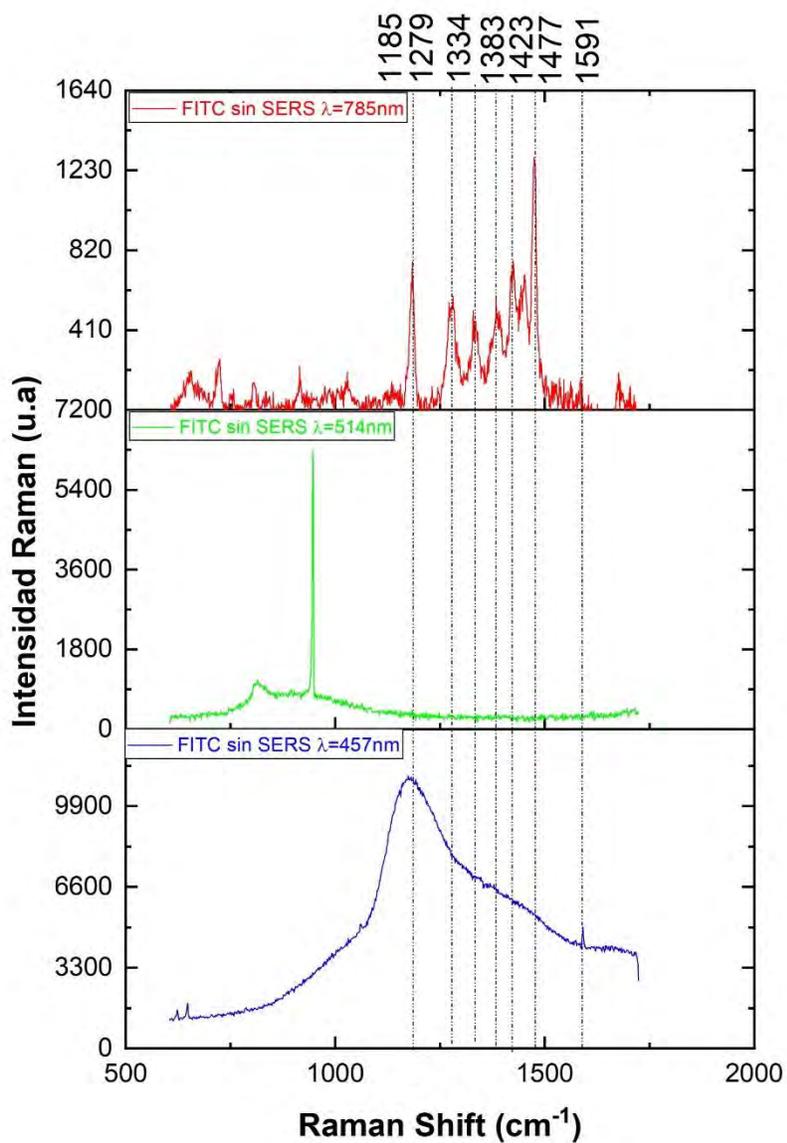


Figura 41. Espectro Raman original del FITC sobre papel aluminio a una concentración de $10^{-3} M$, con longitudes de onda de excitación $\lambda = 457nm$, $\lambda = 514nm$ y $\lambda = 785nm$.

Tabla 6. Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 41.

Longitud de onda de excitación	Picos Raman del FITC sin SERS	Asignación	Referencia
785	1185	Fenol OH	68,69
785	1279	Estiramiento de iones fenóxido conjugado con estiramiento de anillos de xanteno	68,69
785	1334	Xanteno estiramiento C-C	68,69
785	1383	Xanteno estiramiento C-C	68,69
785	1423	Xanteno estiramiento C-C	68,69
785	1477	Xanteno estiramiento C-C	68,69
457	1591	Xanteno C-C conjugado con la banda del carbonilo	68,69

En la Figs. 42, 43 y 44 se pueden observar los espectros Raman del FITC a una concentración de 10^{-3} M sobre los substratos en ausencia de GO, excitados con $\lambda = 457$ nm, $\lambda = 514$ nm y $\lambda = 785$ nm respectivamente. La presencia de nanopartículas metálicas en los substratos permite reducir el efecto de fluorescencia, además, se puede observar que los substratos que involucran Au en su composición son menos eficientes que el substrato S6 el cual contiene Si y el substrato S1-5 el cual no presentó formación de nanopartículas de Au, esto se debe a que las nanopartículas de Au sirven para darle biofuncionalidad al substrato, pero reducen el efecto de las resonancias plasmónicas generadas por las nanopartículas de Ag. La asignación de bandas del FITC a grupos funcionales que se observan en estos espectros, aparecen en las Tablas 7, 8 y 9, donde se puede apreciar el corrimiento de las bandas originales del FITC ubicadas en 1185 cm^{-1} , 1279 cm^{-1} , 1334 cm^{-1} y 1423 cm^{-1} asociadas a los estiramientos de los enlaces C - C en los anillos de xanteno, este corrimiento se debe a la presencia de nanopartículas metálicas. La excitación de los substratos con $\lambda = 785$ nm, permite observar mejor el efecto de amplificación de la señal por efecto SERS ya que hay pocos aportes de fluorescencia en la señal, tal y como se observa en los espectros Raman de los substratos S6 y S1-5 de la Fig. 44.

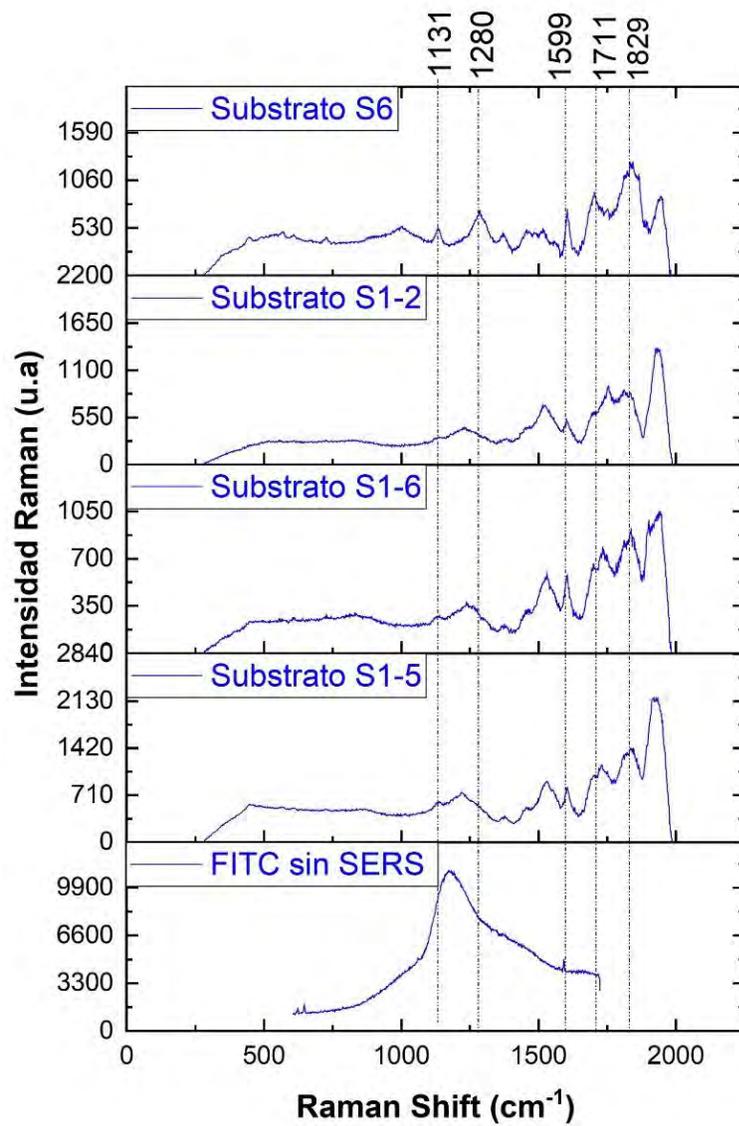


Figura 42. Espectro Raman del FITC de los substratos en ausencia de (GO), S6 (BC/Si/AgNPs), S1-2 (BC/AuNPs/AgNPs), S1-6 (BC/AuNPs/AgNPs) y S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=457$ nm.

Tabla 7. *Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 42.*

FITC sin SERS	Substrato S6	Substrato S1-2	Substrato S1-6	Substrato S1-5	Asignación	Referencia
	1131	1131	1131	1131	Fenol OH	68,69
	1280	1280	1280	1280	Estiramiento de iones fenóxido conjugado con estiramiento de anillos de xanteno	68,69
1591	1599	1599	1599	1599	Xanteno C-C conjugado con la banda del carbonilo	68,69
	1711	1711	1711	1711	-COOH	68,69
	1829	1829	1829	1829	-COOH	68,69

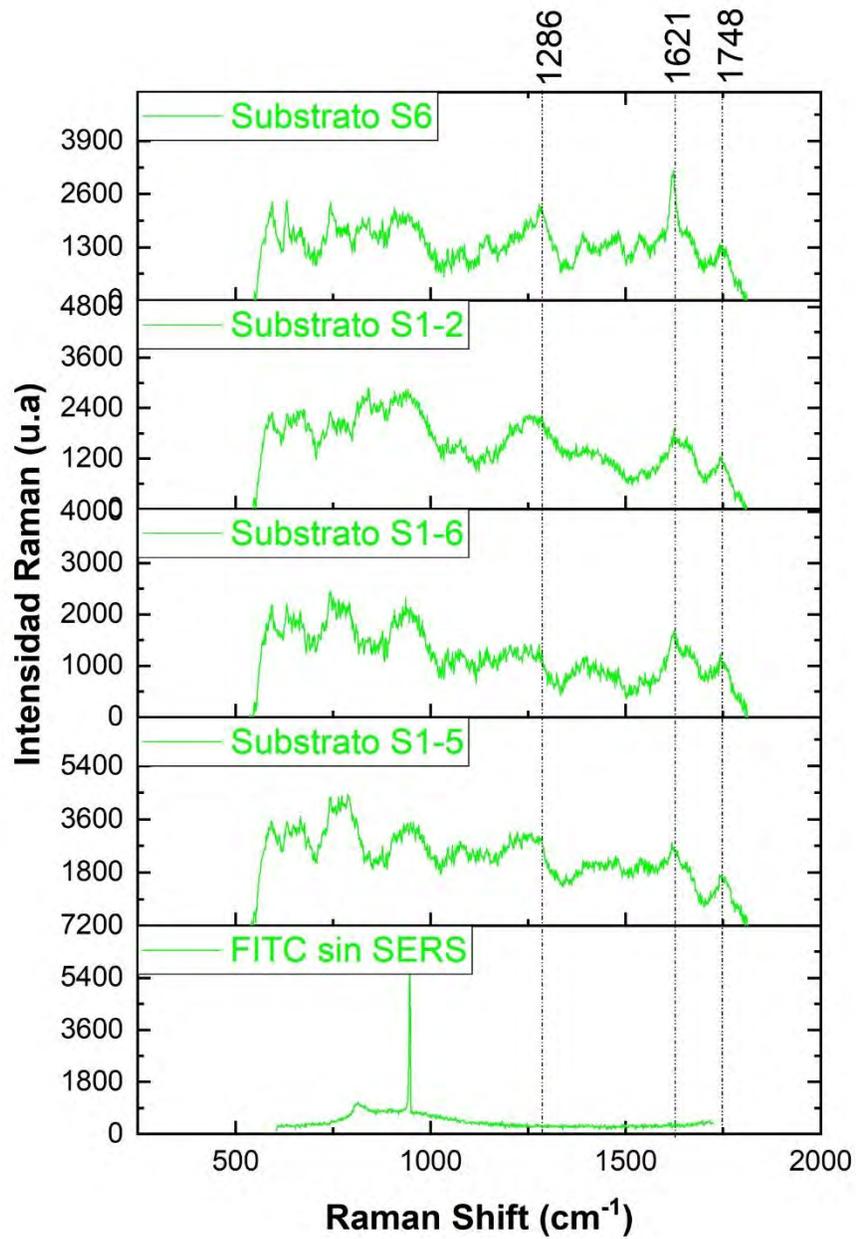


Figura 43. Espectro Raman del FITC de los substratos en ausencia de (GO), S6 (BC/Si/AgNPs), S1-2 (BC/AuNPs/AgNPs), S1-6 (BC/AuNPs/AgNPs) y S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=514$ nm.

Tabla 8. *Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 43.*

FITC sin SERS	Substrato S6	Substrato S1-2	Substrato S1-6	Substrato S1-5	Asignación	Referencia
	1286	1286			Estiramiento de iones fenóxido conjugado con estiramiento de anillo de xantenos	68,69
	1621		1621		Estiramiento C-C del anillo de xanteno	68,69
	1748		1748		-COOH	68,69

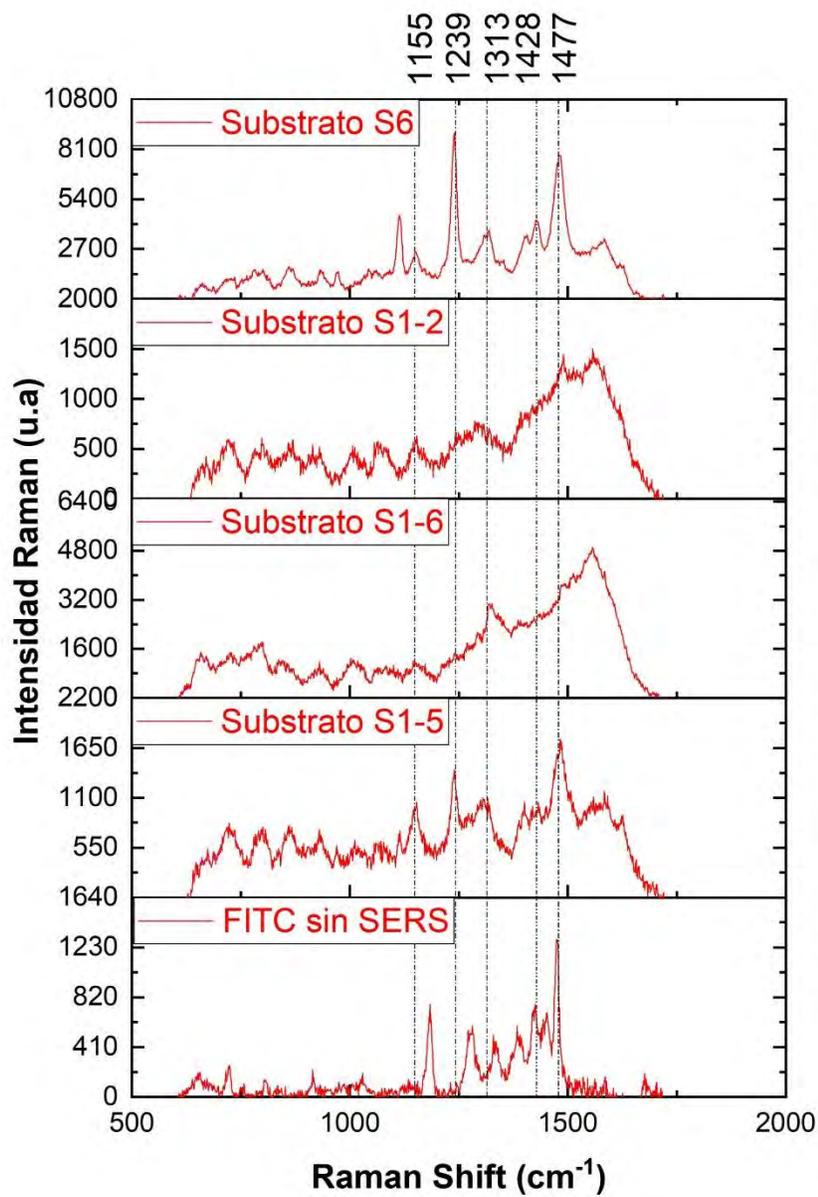


Figura 44. Espectro Raman del FITC de los substratos en ausencia de (GO), S6 (BC/Si/AgNPs), S1-2 (BC/AuNPs/AgNPs), S1-6 (BC/AuNPs/AgNPs) y S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=785$ nm.

Tabla 9. Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 44.

FITC sin SERS	Substrato S6	Substrato S1-2	Substrato S1-6	Substrato S1-5	Asignación	Referencia
1185	1155	1155		1155	Fenol OH	68,69
1279	1239 AEF = 15			1239	Estiramiento de iones fenóxido conjugado con estiramiento de anillos de xantenos	68,69
1334	1313		1313	1313	Xanteno estiramiento C-C	68,69
1423	1428				Xanteno estiramiento C-C	68,69
1477	1477 AEF = 6	1477	1477	1477	Xanteno estiramiento C-C	68,69

En las Figs. 45 y 46 se pueden observar los espectros Raman del FITC a una concentración de 10^{-3} M sobre los sustratos en presencia de GO, excitados con $\lambda = 457$ nm y $\lambda = 514$ nm respectivamente. La presencia de nanopartículas metálicas y GO en los sustratos permite reducir el efecto de fluorescencia, además, se puede observar que los sustratos que involucran Au en su composición son menos eficientes que el sustrato S5 el cual contiene GO y nanopartículas de Ag. La asignación de bandas del FITC a grupos funcionales que se observan en estos espectros, aparecen en las Tablas 10 y 11, donde se puede apreciar el corrimiento de la banda original del FITC asociada a grupos carbonilo, conjugados con el estiramiento del enlace C – C en los anillos de Xanteno, ubicada en 1591 cm^{-1} , el corrimiento de esta banda se debe a la presencia de nanopartículas metálicas y GO. La excitación de los sustratos en presencia de GO con $\lambda = 785$ nm, impide observar la señal Raman del FITC debido a la presencia de grupos funcionales oxigenados en el GO, tal y como se observa en la Fig. 47.

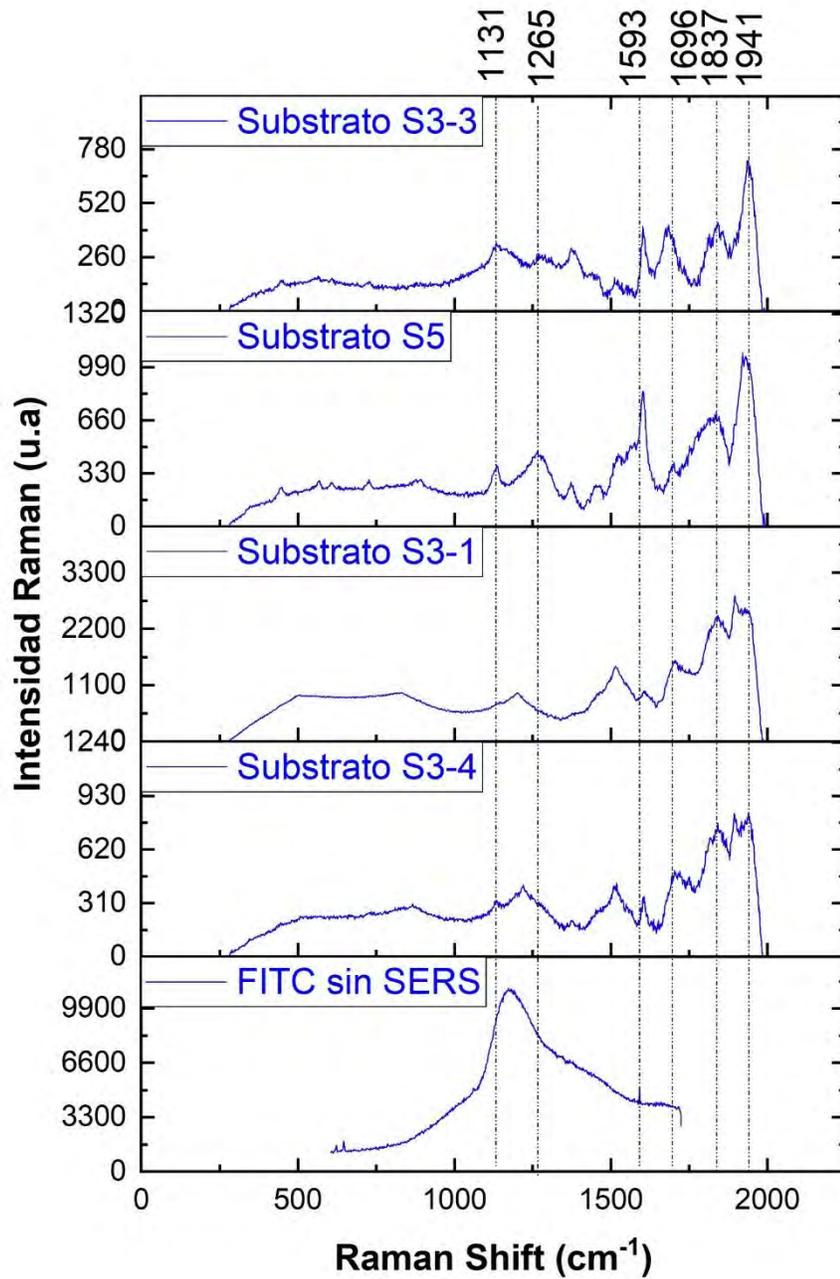


Figura 45. Espectro Raman del FITC de los substratos en presencia de (GO), S3-3 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S5 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S3-1 (BC/GO/AuNps/AgNPs) y S3-4 (BC/GO/AuNps/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=457$ nm.

Tabla 10. *Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 45.*

FITC sin SERS	Substrato S3-3	Substrato S5	Substrato S3-1	Substrato S3-4	Asignación	Referencia
	1131	1131	1131	1131	Fenol OH	68,69
	1265	1265	1265	1265	Estiramiento de iones fenóxido conjugado con estiramiento de anillo de xantenos	68,69
1591	1593	1593	1593	1593	Xanteno C-C conjugado con la banda del carbonilo	68,69
	1696	1696	1696	1696	-COO	68,69
	1837	1837	1837	1837	-COOH	68,69
	1941	1941	1941	1941	-COOH	68,69

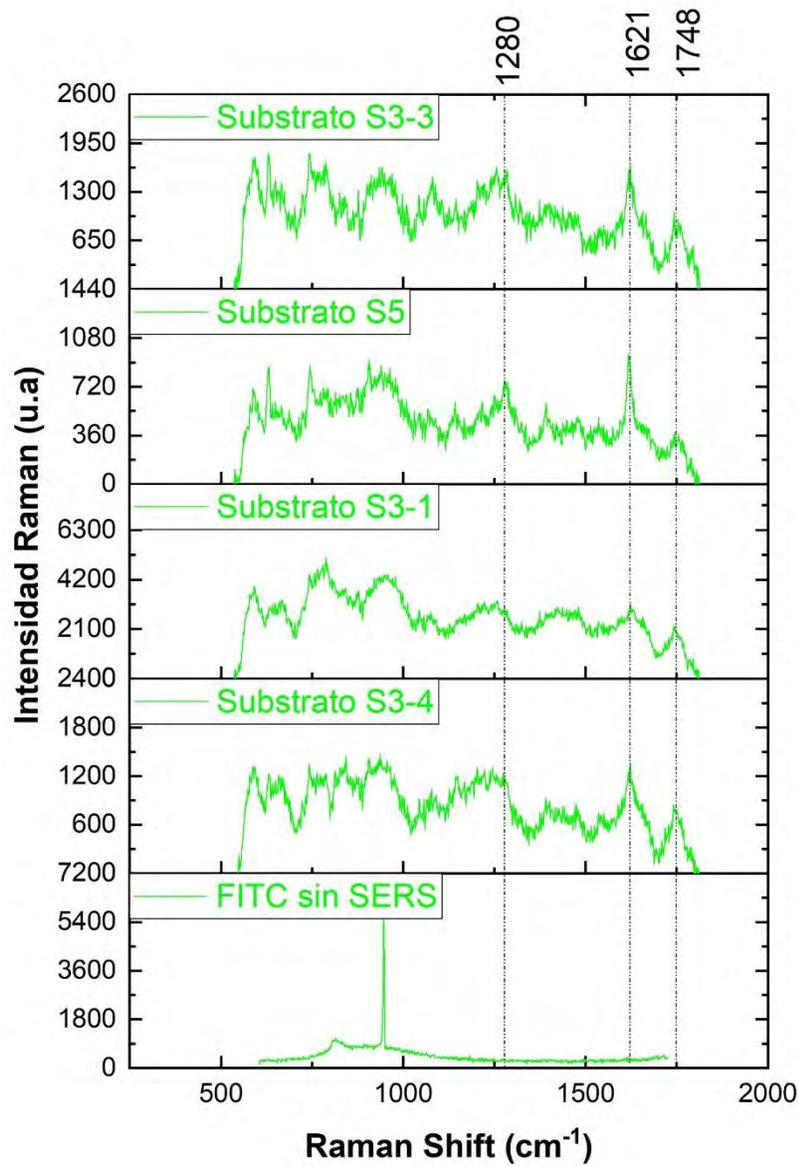


Figura 46. Espectro Raman del FITC de los substratos en presencia de (GO), S3-3 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S5 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S3-1 (BC/GO/AuNps/AgNPs) y S3-4 (BC/GO/AuNps/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=514$ nm.

Tabla 11. *Asignación de bandas a los grupos funcionales del FITC en la Fig. 46.*

FITC sin SERS	Substrato S3-3	Substrato S5	Substrato S3-1	Substrato S3-4	Asignación	Referencia
	1280	1280			Estiramiento de iones fenóxido conjugado con estiramiento de anillos de xanteno	68,69
	1621	1621	1621	1621	Estiramiento C-C del anillo de xanteno	68,69
	1748	1748	1748	1748	-COOH	68,69

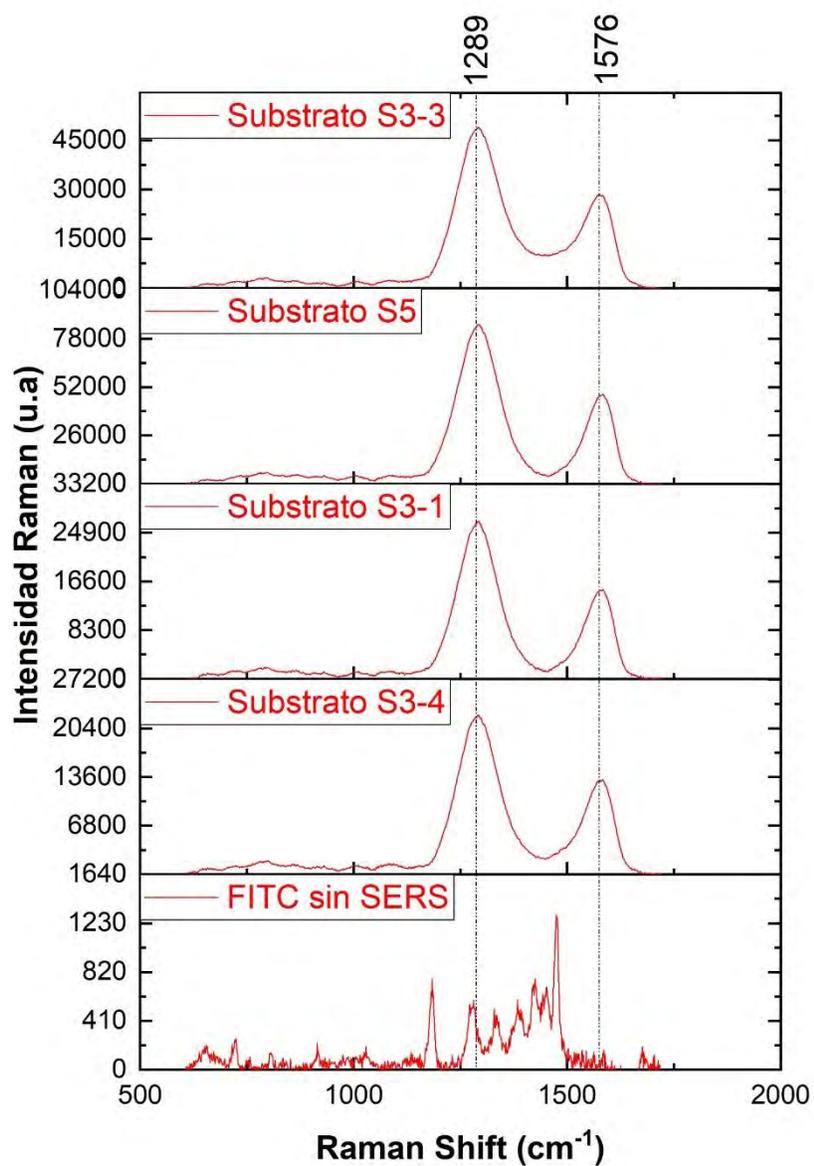


Figura 47. Espectro Raman del FITC de los sustratos en presencia de (GO), S3-3 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S5 (BC/GO/AuNps/AgNPs), S3-1 (BC/GO/AuNps/AgNPs) y S3-4 (BC/GO/AuNps/AgNPs) a una concentración de 10^{-3} M, excitado con $\lambda=785$ nm.

Capítulo 4. Conclusiones

Se fabricaron substratos plasmónicos con nanopartículas metálicas de plata (Ag) y oro (Au) con formas aproximadamente esféricas en presencia y ausencia de GO, substratos plasmónicos con nanopartículas de plata (Ag) en presencia de silicio (Si) y substratos plasmónicos con nanopartículas de plata (Ag) y GO. Los resultados obtenidos demuestran que el uso de GO al inicio de la preparación de los substratos permite obtener una mayor producción de nanopartículas metálicas, además, la presencia de GO en los substratos reduce aún más los efectos de fluorescencia debido a mecanismos de transferencia de carga entre la molécula analito FITC y el GO, las imágenes obtenidas en SEM demuestran la capacidad de las hojas de GO de concentrar un mayor número de nanopartículas, generando lugares de alta mejora en SERS. La excitación de los substratos en presencia de GO con $\lambda = 457 \text{ nm}$ y $\lambda = 514 \text{ nm}$ permiten observar una señal Raman del FITC con menor ruido de fluorescencia a comparación de los substratos en ausencia de GO, mientras que la excitación con $\lambda = 785 \text{ nm}$ impide observar la señal Raman del FITC debido al aporte de grupos funcionales en el GO, sin embargo, los substratos en ausencia de GO permiten registrar una mejor señal Raman del FITC cuando son excitados con $\lambda = 785 \text{ nm}$.

Para continuar con la investigación de este trabajo enfocado en la aplicación de biosensado libre de etiquetas, se recomienda utilizar los substratos en ausencia de GO S6 (BC/Si/AgNPs) y S1-5 (BC/AuNPs/AgNPs) con línea de excitación $\lambda = 785 \text{ nm}$, y los substratos en presencia de GO S3-3 (BC/GO/AuNPs/AgNPs), S3-4 (BC/GO/AuNPs/AgNPs) y S5 (BC/GO/AgNPs)

con líneas de excitación $\lambda = 457 \text{ nm}$ y $\lambda = 514 \text{ nm}$, con el fin de encontrar los límites de detección y el factor de mejoramiento analítico de estos substratos.

Referencias

- [1] Le Ru E, Etchegoin P. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*. Vol 1.; 2009. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- [2] Aroca R. *Surface Enhanced Vibrational Spectroscopy*. Vol 44.; 2006. doi:10.5860/choice.44-2121
- [3] Atkins P, Friedman R. Molecular Quantum Mechanics. *Phys Today*. 1956; 9(3): 42-44. doi:10.1063/1.3059924
- [4] Long DA. *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. 2002. Vol 8.; 2002. doi:10.1002/0470845767
- [5] Gaponenko S V. *Introduction to NANOPHOTONICS*. Cambridge University Press; 2010. ISBN: 9780521763752.
- [6] Hecht LN and B. *Principles of Nano-Optics*. (Press CU, ed.); 2006. ISBN: 9780521832243.
- [7] Wolfman LSBA. *Topics In Theoretical And Computational Nanoscience*. Vol 53. Springer US; 2013. ISBN: 978-1-4419-8249-0.
- [8] McCreery RL. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. Vol 12.; 2001. doi:10.1088/0957-0233/12/5/704
- [9] Smith E, Dent G. *Modern Raman Spectroscopy*.; 2019. doi:10.1002/9781119440598
- [10] Kneipp K, Ozaki Y, Tian Z-Q. *Recent Developments in Plasmon-Supported Raman Spectroscopy*.; 2018. doi:10.1142/q0124
- [11] Tominaga J. *Optical Nanotechnologies*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg; 2003. ISBN: 978-3-540-45871-5.
- [12] Li Z, Jiang S, Huo Y, et al. 3D silver nanoparticles with multilayer graphene oxide as a spacer for surface enhanced Raman spectroscopy analysis. *Nanoscale*. 2018;10(13):5897-5905. doi:10.1039/c7nr09276h
- [13] Zhao X, Yu J, Zhang C, et al. Flexible and stretchable SERS substrate based on a pyramidal PMMA structure hybridized with graphene oxide assivated AgNPs. *Appl Surf Sci*. 2018;455(June):1171-1178. doi:10.1016/j.apsusc.2018.06.094

- [14] Shanta P V., Cheng Q. Graphene Oxide Nanoprisms for Sensitive Detection of Environmentally Important Aromatic Compounds with SERS. *ACS Sensors*. 2017;2(6):817-827. doi:10.1021/acssensors.7b00182
- [15] Baia M. *Raman and SERS Investigations of Pharmaceuticals*. Vol 53. Springer; 2008. ISBN: 978-3-540-78282-7.
- [16] Ru EC Le, Blackie E, Meyer M, Etchegoin PG. SERS: A Comprehensive Study. 2007; (doi):13794-13803.
- [17] Qiu H, Wang M, Zhang L, et al. Insights into the role of graphene in hybrid photocatalytic system by in-situ shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Carbon N Y*. 2019;152:305-315. doi:10.1016/j.carbon.2019.06.025.
- [18] Sun D. Microplasma assisted synthesis of gold nanoparticle/graphene oxide nanocomposites and their potential application in SERS sensing. *Geophys Res Lett*. 2017;in press:0-31. doi: 10.1088/1361-6528/ab2a23.
- [19] Nair AK, Bhavitha KB, Perumbilavil S, et al. Multifunctional nitrogen sulfur co-doped reduced graphene oxide – Ag nano hybrids (sphere, cube and wire) for nonlinear optical and SERS applications. *Carbon N Y*. 2018;132:380-393. doi:10.1016/j.carbon.2018.02.068
- [20] Li X, Demartino GN. Plasmonic silvered nanostructures on macroporous silicon decorated with graphene oxide for SERS-spectroscopy. 2009. doi: 10.1088/1361-6528/aad250.
- [21] Song Y, Zhang Y, Huang Y, Fan Y, Lai K. Rapid Determination of Thiram Residues in Fruit Juice by surface-enhanced Raman Scattering Coupled with a Gold@Silver nanoparticle-graphene Oxide Composite. *Anal Lett*. 2020;53(7):1003-1018. doi:10.1080/00032719.2019.1691220
- [22] Vianna PG, Grasseschi D, Domingues SH, de Matos CJS. 11.Real-time optofluidic surface-enhanced Raman spectroscopy based on a graphene oxide/gold nanorod nanocomposite. *Opt Express*. 2018;26(18):22698. doi:10.1364/oe.26.022698
- [23] Li C, Liu Y, Liang A, Jiang Z. SERS quantitative analysis of trace ferritin based on immunoreaction regulation of graphene oxide catalytic nanogold reaction. *Sensors Actuators, B Chem*. 2018;263:183-189. doi:10.1016/j.snb.2018.02.080
- [24] Yang L, Zhen SJ, Li YF, Huang CZ. Silver nanoparticles deposited on graphene oxide for ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering immunoassay of cancer biomarker. *Nanoscale*. 2018;10(25):11942-11947. doi:10.1039/c8nr02820f.
- [25] Zhang J, Ma X, Wang Z. Surface-Enhanced Raman Scattering-Fluorescence Dual-Mode Nanosensors for Quantitative Detection of Cytochrome c in Living Cells. *Anal Chem*. Published online 2019. doi:10.1021/acs.analchem.9b00480

- [26] Zeng F, Xu D, Zhan C, et al. Surfactant-free synthesis of graphene oxide coated silver nanoparticles for sers biosensing and intracellular drug delivery. *ACS Appl Nano Mater.* 2018;1(6):2748-2753. doi:10.1021/acsanm.8b00444
- [27] Liu Y, Bao J, Zhang L, et al. Ultrasensitive SERS detection of propranolol based on sandwich nanostructure of molecular imprinting polymers. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018;255:110-116. doi:10.1016/j.snb.2017.08.018
- [28] Guo J, Xu S, Liu X, et al. Graphene oxide-Ag nanoparticles-pyramidal silicon hybrid system for homogeneous, long-term stable and sensitive SERS activity. *Appl Surf Sci.* 2017;396:1130-1137. doi:10.1016/j.apsusc.2016.11.098
- [29] Shi G, Wang M, Zhu Y, Wang Y, Xu H. A novel natural SERS system for crystal violet detection based on graphene oxide wrapped Ag micro-islands substrate fabricated from Lotus leaf as a template. *Appl Surf Sci.* 2018;459(July):802-811. doi:10.1016/j.apsusc.2018.08.065
- [30] Khalil I, Yehye WA, Julkapli NM, et al. Graphene oxide and gold nanoparticle based dual platform with short DNA probe for the PCR free DNA biosensing using surface-enhanced Raman scattering. *Biosens Bioelectron.* 2019;131:214-223. doi:10.1016/j.bios.2019.02.028
- [31] Zhu J, Du HF, Zhang Q, et al. SERS detection of glucose using graphene-oxide-wrapped gold nanobones with silver coating. *J Mater Chem C.* 2019;7(11):3322-3334. doi:10.1039/c8tc05942j
- [32] Naqvi TK, Srivastava AK, Kulkarni MM, Siddiqui AM, Dwivedi PK. Silver nanoparticles decorated reduced graphene oxide (rGO) SERS sensor for multiple analytes. *Appl Surf Sci.* 2019;478(November 2018):887-895. doi:10.1016/j.apsusc.2019.02.026
- [33] Li Y, Yang J, Zhong T, et al. Fast and green synthesis of silver nanoparticles/reduced graphene oxide composite as efficient surface-enhanced Raman scattering substrate for bacteria detection. *Monatshefte fur Chemie.* 2017;148(7):1155-1163. doi:10.1007/s00706-017-1990-0
- [34] Xiao G, Li Y, Shi W, Shen L, Chen Q, Huang L. Highly sensitive, reproducible and stable SERS substrate based on reduced graphene oxide/silver nanoparticles coated weighing paper. *Appl Surf Sci.* 2017;404:334-341. doi:10.1016/j.apsusc.2017.01.231
- [35] Chettri P, Vendamani VS, Tripathi A, Singh MK, Pathak AP, Tiwari A. Green synthesis of silver nanoparticle-reduced graphene oxide using Psidium guajava and its application in SERS for the detection of methylene blue. *Appl Surf Sci.* 2017;406:312-318. doi:10.1016/j.apsusc.2017.02.073
- [36] Zhang C yun, Hao R, Zhao B, et al. Graphene oxide-wrapped flower-like silver particles for surface-enhanced Raman spectroscopy and their applications in

- polychlorinated biphenyls detection. *Appl Surf Sci.* 2017;400:49-56. doi:10.1016/j.apsusc.2016.12.161
- [37] Cui S li, Du X qing, Zeng C, Li L, Bao J. Effect of pH value of probe molecule on the graphene oxide-based surface enhanced Raman scattering. *Appl Phys A Mater Sci Process.* 2017;123(6). doi:10.1007/s00339-017-1010-6
- [38] Guo Y, Tao Y, Ma X, et al. A dual colorimetric and SERS detection of Hg²⁺ based on the stimulus of intrinsic oxidase-like catalytic activity of Ag-CoFe₂O₄/reduced graphene oxide nanocomposites. *Chem Eng J.* 2018;350:120-130. doi:10.1016/j.cej.2018.05.135
- [39] Kim YK, Ok G, Choi SW, Jang H, Min DH. The interfacing structural effect of Ag/graphene oxide nanohybrid films on surface enhanced Raman scattering. *Nanoscale.* 2017;9(18):5872-5878. doi:10.1039/c7nr00308k
- [40] Yan D, Qiu L, Xue M, Meng Z, Wang Y. A flexible surface-enhanced Raman substrates based on cellulose photonic crystal/Ag-nanoparticles composite. *Mater Des.* 2019;165:107601. doi:10.1016/j.matdes.2019.107601
- [41] Pan X, Li L, Lin H, et al. A graphene oxide-gold nanostar hybrid based-paper biosensor for label-free SERS detection of serum bilirubin for diagnosis of jaundice. *Biosens Bioelectron.* 2019;145(September):111713. doi:10.1016/j.bios.2019.111713
- [42] Lu Z, Liu Y, Wang M, et al. A novel natural surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrate based on graphene oxide-Ag nanoparticles-Mytilus coruscus hybrid system. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018;261:1-10. doi:10.1016/j.snb.2018.01.113
- [43] Liang A, Li X, Zhang X, Wen G, Jiang Z. A sensitive SERS quantitative analysis method for Ni²⁺ by the dimethylglyoxime reaction regulating a graphene oxide nanoribbon catalytic gold nanoreaction. *Luminescence.* 2018;33(6):1033-1039. doi:10.1002/bio.3504
- [44] Li C, Wang X, Liang A, Luo Y, Wen G, Jiang Z. A simple gold nanoplasmonic SERS method for trace Hg²⁺ based on aptamer-regulating graphene oxide catalysis. *Luminescence.* 2018;33(6):1113-1121. doi:10.1002/bio.3517
- [45] Siljanovska Petreska G, Salsamendi M, Arzac A, et al. Covalent-Bonded Reduced Graphene Oxide-Fluorescein Complex as a Substrate for Extrinsic SERS Measurements. *ACS Omega.* 2017;2(8):4123-4131. doi:10.1021/acsomega.7b00184
- [46] Zhang M, Meng J, Wang D, et al. Biomimetic synthesis of hierarchical 3D Ag butterfly wing scale arrays/graphene composites as ultrasensitive SERS substrates for efficient trace chemical detection. *J Mater Chem C.* 2018;6(8):1933-1943. doi:10.1039/c7tc03922k
- [47] Wang Y, Zhang M, Yu H, et al. Facile fabrication of Ag/graphene oxide/TiO₂ nanorod array as a powerful substrate for photocatalytic degradation and surface-enhanced Raman scattering detection. *Appl Catal B Environ.* 2019;252:174-186.

doi:10.1016/j.apcatb.2019.03.084

- [48] Qu LL, Wang N, Zhu G, et al. Facile fabrication of ternary TiO₂-gold nanoparticle-graphene oxide nanocomposites for recyclable surface enhanced Raman scattering. *Talanta*. 2018;186(April):265-271. doi:10.1016/j.talanta.2018.04.062
- [49] Gomez IJ, Arnaiz B, Cacioppo M, Arcudi F, Prato M. Nitrogen-doped Carbon Nanodots for bioimaging and delivery of paclitaxel. *J Mater Chem B*. 2018;6(35). doi:10.1039/x0xx00000x
- [50] Zhang M, Chen Z, Wang Z, Zheng Z, Wang D. Graphene oxide coated popcorn-like Ag nanoparticles for reliable sensitive surface-enhanced Raman scattering detection of drug residues. *J Mater Res*. 2019;34(17):2935-2943. doi:10.1557/jmr.2019.78
- [51] Naqvi TK, Sree Satya Bharati M, Srivastava AK, et al. Hierarchical Laser-Patterned Silver/Graphene Oxide Hybrid SERS Sensor for Explosive Detection. *ACS Omega*. 2019;4(18):17691-17701. doi:10.1021/acsomega.9b01975
- [52] Jiang Y, Wang J, Malfatti L, Carboni D, Senes N, Innocenzi P. Highly durable graphene-mediated surface enhanced Raman scattering (G-SERS) nanocomposites for molecular detection. *Appl Surf Sci*. 2018;450:451-460. doi:10.1016/j.apsusc.2018.04.218
- [53] Sun Y, Chen H, Ma P, et al. In situ synthesis of graphene oxide/gold nanocomposites as ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering substrates for clenbuterol detection. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(1):193-201. doi:10.1007/s00216-019-02230-1
- [54] Lv W, Liu C, Ma Y, Wang X, Luo J, Ye W. Multi-hydrogen bond assisted SERS detection of adenine based on multifunctional graphene oxide/poly (diallyldimethyl ammonium chloride)/Ag nanocomposites. *Talanta*. 2019;204(June):372-378. doi:10.1016/j.talanta.2019.06.012
- [55] Zhang A, Chang J, Chen Y, et al. Spontaneous implantation of gold nanoparticles on graphene oxide for salivary SERS sensing. *Anal Methods*. 2019;11(40):5089-5097. doi:10.1039/c9ay01500k
- [56] Zhao Y, Song Y, Zhang Y, Fan Y, Lai K. Ultra sensitive detection of malachite green in fish muscle with gold nanoparticles and graphene oxide hybrid as a substrate for surface enhanced Raman scattering. *J Food Meas Charact*. 2020;14(2):658-667. doi:10.1007/s11694-019-00312-3
- [57] Xu W, Mao N, Zhang J. Graphene: A platform for surface-enhanced Raman spectroscopy. *Small*. 2013;9(8):1206-1224. doi:10.1002/smll.201203097
- [58] Golmohammadi H, Morales-Narváez E, Naghdi T, Merkoçi A. Nanocellulose in Sensing and Biosensing. *Chem Mater*. 2017;29(13):5426-5446.

doi:10.1021/acs.chemmater.7b01170

- [59] Dufresne A. Nanocellulose Processing Properties and Potential Applications. *Curr For Reports*. Published online 2019. doi:10.1007/s40725-019-00088-1
- [60] Rodríguez-Sevilla E, Vázquez GV, Morales-Narváez E. Simple, Flexible, and Ultrastable Surface Enhanced Raman Scattering Substrate Based on Plasmonic Nanopaper Decorated with Graphene Oxide. *Adv Opt Mater*. 2018;6(19):1-9. doi:10.1002/adom.201800548
- [61] Enoki T, Ando T. *Physics and Chemistry of Graphene: Graphene to Nanographene.*; 2013. doi:10.1201/b14396
- [62] Pemmaraju S, Skiena S. *Properties of Graphs.*; 2012. doi:10.1017/cbo9781139164849.008
- [63] Almohammed S, Zhang F, Rodriguez BJ, Rice JH. Electric Field-Induced Chemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Enhancement from Aligned Peptide Nanotube-Graphene Oxide Templates for Universal Trace Detection of Biomolecules. *J Phys Chem Lett*. 2019;10(8):1878-1887. doi:10.1021/acs.jpcllett.9b00436
- [64] Ghopry SA, Alamri MA, Goul R, Sakidja R, Wu JZ. Extraordinary Sensitivity of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Molecules on MoS₂ (WS₂) Nanodomes/Graphene van der Waals Heterostructure Substrates. *Adv Opt Mater*. 2019;7(8):1-11. doi:10.1002/adom.201801249
- [65] Chen C, Oladele O, Tang Y, Yan F. Freestanding silver dendrite/graphene oxide composite membranes as high-performance substrates for surface-enhanced Raman scattering. *Mater Lett*. 2018;226:83-86. doi:10.1016/j.matlet.2018.05.030
- [66] Liu M, Zheng C, Cui M, et al. Graphene oxide wrapped with gold nanorods as a tag in a SERS based immunoassay for the hepatitis B surface antigen. *Microchim Acta*. 2018;185(10). doi:10.1007/s00604-018-2989-x
- [67] Jiang Y, Carboni D, Malfatti L, Innocenzi P. Graphene oxide-silver nanoparticles in molecularly-imprinted hybrid films enabling SERS selective sensing. *Materials (Basel)*. 2018;11(9). doi:10.3390/ma11091674
- [68] Zhang, D., Vangala, K., Jiang, D., Zou, S. and Pechan, T., 2010. Drop Coating Deposition Raman Spectroscopy of Fluorescein Isothiocyanate Labeled Protein. *Applied Spectroscopy*, 64(10), pp.1078-1085. doi: 10.1366/000370210792973497.
- [69] Maeda, T., Nagahara, T., Aida, M. and Ishibashi, T., 2008. Identification of chemical species of fluorescein isothiocyanate isomer-I (FITC) monolayers on platinum by doubly resonant sum-frequency generation spectroscopy. *Journal of Raman*

Spectroscopy, 39(11), pp.1694-1702. doi: 10.1002/jrs.2131.