FLUORESCENCIA INTENSIFICADA POR EFECTO SUPERFICIAL

JOHANNA ALEXANDRA GOMEZ SANTOS

Director:
Dr. Rer. Nat. Orlando Aya Ramírez

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
POSTGRADO EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007

FLUORESCENCIA INTENSIFICADA POR EFECTO SUPERFICIAL

JOHANNA ALEXANDRA GOMEZ SANTOS

Trabajo de grado presentado como
Requisito parcial para optar al titulo de
Magíster en Química.

Director:
ORLANDO AYA RAMIREZ
Dr. Rer. Nat.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

POSTGRADO EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2007

Para mi Madre, la Mujer que me apoyó todo estos años y a quien quiero y admiro infinitamente

Para David, a quien amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que de una o otra forma han contribuido a mi formación como persona y profesional, muy especialmente a:

A mi madre, por su infinito amor, cariño, comprensión, paciencia y apoyo. Por acompañarme en los buenos y malos momentos. Por ayudarme a que este momento llegara. Gracias a su esfuerzo logró que hoy sea quien soy.

A David, por estar siempre a mi lado apoyando, dándome fuerza para seguir adelante, por entregarme su amor incondicional. Por ayudarme cada día a ser alguien mejor.

Al Dr. Rer. Nat. Orlando Aya Ramírez, por compartir conmigo su enorme conocimiento y por su gran apoyo y colaboración para la realización de este trabajo.

A los profesores Enrique Mejía y Rafael Cabanzo, por su colaboración y sus enseñanzas, además por ser ejemplos como científicos, profesores, compañeros y amigos.

A mis compañeros del Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular, Sharo, María, Gustavo, Juan pablo, Javier, Rafael, Julián y todos los demás.

A mis amigos.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1. MARCO DE REFERENCIA	3
1.1 FOTOFÍSICA MOLECULAR	3
1.2 FLUORESCENCIA	7
1.2.1 Características de la emisión de fluorescencia	7
1.2.2 Variables que afectan la fluorescencia	11
1.2.3 Tiempo de vida media y rendimiento cuántico	14
1.2.4 Fluorescencia Inducida por Láser (LIF)	15
1.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN	16
1.3.1 Breve descripción del efecto Raman	17
1.3.2 Raman Resonante	22
1.4 EFECTOS DE LAS SUPERFICIES SOBRE LOS FENOMENOS FOTOFISICOS	23
1.4.1 Plasmones superficiales	23
1.4.2 Fluorescencia Intensificada por efecto Superficial (SEF)	25
1.4.3 Dispersión Raman Intensificada por efecto Superficial (SERS)	30
1.4.4 Transferencia de Energía Resonante (FRET)	36
1.4.5 Transferencia de Cargas	38
2. PARTE EXPERIMENTAL	40
2.1 MONTAJE DEL SISTEMA ESPECTROSCOPICO	41
2.2 PREPARACION DE SUPERFICIES ADECUADAS PARA SEF Y SERS	45
2.2.1 Preparación de Coloides	46
2.2.1.1 Reducción química	46
2.2.1.2 Ablación láser	47
2.2.2 Películas islas (SIF'S)	48
2.2.3 Películas autoensambladas	49

2.3 ESTUDIO DEL EFECTO DE INTENSIFICACIÓN SUPERFICIAL 49
3. RESULTADOS Y ANALISIS 51
3.1 EVALUACIÓN DEL SISTEMA ESPECTROSCOPICO 51
3.1.1 Portamuestra 52
3.1.2 Evaluación del sistema de enfoque 53
3.1.3 Fuente de excitación 54
3.1.4 Detector 54
3.2 PRUEBAS DE FLUORESCENCIA 56
3.3 PRUEBAS DE DISPERSIÓN RAMAN 58
3.4 SUPERFICIES PARA SEF Y SERS 60
3.4.1 Coloides 62
3.5 PRUEBAS SEF 67
3.6 PRUEBAS SERS 70
4. CONCLUSIONES 75
5. RECOMENDACIONES 77
BIBLIOGRAFÍA 78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de energía de Jablonski: descripción esquemática de los diferentes procesos fotofísicos que pueden tener lugar tras la excitación inicial desde el estado fundamental.

Figura 2 Espectro de fluorescencia: Imagen especular del espectro de Absorci*ó*n

Figura 3 Espectros de absorción y emisión de sulfato de Quinina. Excepción de la regla de la imagen especular

Figura 4 Espectros de absorción y emisión de p-terfenilo. Excepción de la regla de la imagen especular

Figura 5 Origen de la dispersión Raman y Rayleigh.

Figura 6 Espectro Raman

Figura 7 Diagrama de energía para la dispersión Raman de resonancia

Figura 8 Plasmones superficiales en una superficie metálica plana

Figura 9 Plasmones superficiales en coloides

Figura 10 Diagrama de energía de Jablonski sin metal y modificado con metal a la derecha

Figura 11 Mecanismo electromagnético SERS

Figura 12 Estados implicados en los mecanismos a) Raman, b) resonancia Raman (RR) y c) SERS en resonancia con estados de transferencia de carga (SERS-CT) del complejo superficial M-A.

Figura 13 Solapamiento espectral para Transferencia de Energía Resonante (RET).

Figura 14 Configuración experimental típica LIF

Figura 15 Montaje experimental para LIF

Figura 16 Montaje experimental para LIF con capilar como portamuestra

Figura 17 Montaje experimental para LIF sobre placas de vidrio

Figura 18 Montaje experimental para preparación de coloides por ablación láser
Figura 19 Intensidad de fluorescencia vs. Concentración utilizando el láser de Nd-YAG (532nm)como fuente de excitación
Figura 20 Intensidad de fluorescencia vs. Concentración utilizando el láser de nitrógeno, como fuente de excitación
Figura 21 Espectro de fluorescencia de Sulforodamina B $4.69x10^{-4}$M . Enfocando con los lentes esférico y cilíndrico
Figura 22 Espectro Raman de benceno 2M
Figura 23 Espectro de fluorescencia de sulforodamina B
Figura 24 Espectro de fluorescencia de antraceno $1x10^{-3}$M
Figura 25 Espectro de fluorescencia de Coumarina 307 $5,5x10^{-3}$·M excitado con el láser de nitrógeno
Figura 26 Espectro de fluorescencia de Rodamina 6G perclorato $2x10^{-6}$·M excitado con el láser de Nd-YAG
Figura 27 Espectro Raman de Tetracloruro de Carbono
Figura 28 Espectro Raman de Benceno 2M
Figura 29 Espectro Raman de Piridina 4M
Figura 30 Espectros de absorción de coloides de plata preparados por reducción química
Figura 31 Espectros de absorción UV-vis de nanopartículas de oro por ablación láser en función de tiempo de ablación
Figura 32 Espectros de absorción UV-vis de nanopartículas de plata por ablación láser en función de tiempo de ablación
Figura 33 Espectros de absorción UV-vis de nanopartículas de plata por ablación láser en diferentes solventes
Figura 34 Espectros de absorción UV-vis de nanopartículas de plata por ablación láser y dispersado

Figura 35 Espectros de fluorescencia de Sulforodamina B en presencia de coloide de plata. Excitación láser de Nd-YAG
Figura 36 Espectros de fluorescencia de Antraceno en presencia de coloide de plata. Excitación láser de Nitrógeno
Figura 37 Espectros SEF de Sulforodamina B $4.69x10^{-9}$M sobre películas islas de plata
Figura 38 Espectros Raman de benceno 2M en presencia de coloides
Figura 39 Espectros Raman de piridina 2M en presencia de coloides
Figura 40 Espectros SERS de benceno 2M mezclado con coloide de plata
Figura 41 Espectros Raman de Benceno 2M en presencia de coloide de plata

TITULO: FLUORESCENCIA INTENSIFICADA POR EFECTO SUPERFICIAL[*]

Autor: Johanna Alexandra Gómez Santos[**]

Palabras claves: plasmones superficiales, SEF, SERS.

RESUMEN

La generación de plasmones, como resultado de interacción de micro-nanoestructuras periódicas de metales nobles, con el campo electromagnético, ha generado interesantes posibilidades tanto para la manipulación y transferencia de señales electrónicas como en el campo de la espectroscopía atómico–molecular. El estudio de éstos ha dado lugar a una nueva y dinámica área de investigación: La Plasmónica. En general podemos identificar dos posibilidades: Manipulación de los procesos de fluorescencia por interacción de los fluoróforos con micro-nanoestructuras metálicas de tamaños y a distancias controladas, en donde a distancias muy cortas (0-20 nm) se observa apagamiento de la fluorescencia y a mayores distancias (25-100 nm) intensificación, este último es el objetivo de la Fluorescencia Intensificada por efecto Superficial SEF; Manipulación de los procesos de dispersión Raman; la interacción a bajas distancias genera intensificación de la dispersión Raman, factores de hasta 10^4, y a esto se suma el apagamiento de fluorescencia que facilita la observación de señales Raman, este es el objetivo de la Espectroscopía Raman Intensificada por Efecto Superficial SERS.

Dentro del programa de Espectroscopía Láser del LEAM , estamos desarrollando la implementación experimental de éstos dos procedimientos: SEF y SERS, con base en nuestras posibilidades instrumentales; aquí reportamos resultados iniciales de éstos desarrollos.

---

[*] Trabajo de grado

[**] Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: Dr. Rer. Nat. Orlando Aya Ramírez

TITLE: SURFACE ENHANCED FLUORESCENCE[*]

Autor: Johanna Alexandra Gómez Santos[**]

Key Words: plasmon surface, SEF, SERS.

ABSTRACT

The generation of plasmons as consequence of interaction of electromagnetic field with periodic micro-nanostructures of noble metals, has generated interesting possibilities both the handling and transferring of electronical signals and atomic and molecular spectroscopy field. Study these interactions has given rise a new and dynamic area of investigation: The plasmonics. In general, we can identify two possibilities: Handling fluorescence process for fluorophores interaction with metallic micro-nanostructures with size and controlled distance, it has been observed that at short distances (0-20nm) fluorescence quenching occurs, and at large distances (25-100nm) the fluorescence is enhanced, last one is the objective of surface enhanced fluorescence effect, SEF. Handling Raman scattering process; the interactions at low distances generates enhanced Raman scattering (until 10^4 times). In addition, fluorescence quenching at these distances facilitates Raman signals observation, this is the objective of the Espectroscopía Raman Intensified by Superficial Effect SERS.

Inside the Laser Spectroscopy program of LEAM, we are developing the experimental implementation of these two procedures: SEF and SERS, based on our instrumental possibilities; Here we report initial results of these developments.

---

[*] Project of degree.

[**] Science College. Department of Chemistry. Director: Dr. Rer. Nat. Orlando Aya Ramírez

INTRODUCCION

La generación de Plasmones Superficiales (oscilaciones resonantes de la densidad de electrones de conducción), como resultado de interacción de micro-nanoestructuras periódicas de metales nobles, películas (SIF, Silver Island films) o coloides metálicos, con el campo electromagnético, ha generado interesantes posibilidades tanto para la manipulación y transferencia de señales electrónicas como en el campo de la Espectroscopía atómico–molecular. El estudio de éstos, ha dado lugar a una nueva y dinámica área de investigación: La Plasmónica.

Dentro de ésta disciplina se destaca el estudio del efecto de los plasmones sobre los parámetros fotofísicos de estructuras atómico moleculares que abre la posibilidad de controlar el proceso espectroscópico. En general se pueden identificar dos posibilidades:

1. Manipulación de los procesos de Fluorescencia por interacción de los fluoróforos con micro-nano estructuras metálicas de tamaños y a distancias controladas. En donde a distancias muy cortas (0 a 20nm) fluoróforo-microestructura, normalmente se observa apagamiento de fluorescencia. Sin embargo, a mayores distancias (25 a 100nm) se observa intensificación de la fluorescencia (incremento de rendimiento cuántico, disminución del tiempo de vida media, incremento de rata de decaimiento, incremento de la fotoestabilidad), así como extensión del efecto de transferencia de energía resonante de fluorescencia, FRET.

El efecto de intensificación es muy importante para aplicaciones de la fluorescencia a diversos campos de detección; como son, desarrollo de sensores, estudios estructurales, estudio de cinética de procesos fotoquímicos; en los cuales es necesario la fabricación cuidadosa de sistemas de espaciamiento entre las

nanoestructuras metálicas y el fluoróforo. Este es el objetivo de la Fluorescencia Intensificada por efecto Superficial, SEF.

2. Manipulación de los procesos de dispersión de radiación, efecto raman. La interacción a bajas distancias fluoróforo–microestructura genera incremento apreciable del campo efectivo de excitación y de la polarizabilidad de los sistemas dispersantes, dando lugar a intensificación de la dispersión Raman, factores de hasta 10^4.

La intensificación raman, sumada al apagamiento de fluorescencia a bajas distancias ha abierto enormes posibilidades a las aplicaciones de la Espectroscopía Raman, desde sofisticados estudios estructurales hasta detección de elevada sensibilidad. Este es el objetivo de la Espectroscopía Raman Intensificada por Efecto Superficial, SERS.

Enmarcados en este contexto, dentro del programa de Espectroscopia láser del Laboratorio de Espectroscopia Atómica y Molecular (LEAM); se esta desarrollando la implementación experimental de estos dos procedimientos, SEF y SERS, con base en las posibilidades instrumentales del laboratorio.

Para este trabajo, se diseñó y montó un sistema para espectroscopia SEF, SERS, fluorescencia inducida por láser (LIF) y raman, con los elementos existentes en el LEAM; así mismo, se utilizaron diferentes procedimientos y técnicas para la obtención de películas islas y coloides de plata y oro apropiados para SEF y SERS, con el objetivo de comprobar los efectos de intensificación superficial en moléculas de interés. Con este primer estudio, se espera contribuir al desarrollo de nuevas aplicaciones en diferentes campos; en donde la posibilidad de observar fenómenos en condiciones no comunes motivaron los esfuerzos por comprobar estos efectos en el laboratorio.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1. FOTOFÍSICA MOLECULAR

Cuando un fotón se acerca a una molécula se produce una interacción entre el campo eléctrico asociado a la molécula y el campo eléctrico asociado a la radiación. Esta perturbación puede conducir a que la molécula absorba un fotón, el cual deja de existir y transfiere su energía a la molécula, produciendo una modificación de su estructura electrónica. Esta variación se ve reflejada en la modificación de la ocupación de los orbítales moleculares que conforman la configuración electrónica del estado fundamental.

La absorción de un fotón envía al fluoróforo a un estado excitado singulete S_1, S_2, S_3, ... Obviamente, la molécula electrónicamente excitada es inestable respecto al estado fundamental, por lo que si no modifica su estructura química mediante un proceso fotoquímico, tenderá a perder su energía de excitación para volver al estado fundamental, dando lugar a un proceso fotofísico. Un proceso fotofísico se distingue de uno fotoquímico, en que éste supone únicamente un cambio en el estado electrónico de la molécula sin que se produzca ninguna modificación en su naturaleza química, mientras que en un proceso fotoquímico si lo hay.

En realidad, hay diferentes vías posibles de deexcitación tanto fotoquímica como fotofísicamente (ver el diagrama de Jablonski en la figura 1). La más favorable dependerá del tipo de molécula y de la naturaleza de los estados excitados implicados.

Estos caminos de deexcitación suelen ser procesos muy rápidos y se pueden clasificar en tres categorías bien diferenciadas:

1. Procesos radiativos, que implican la emisión de radiación electromagnética desde el estado electrónicamente excitado para regresar al estado electrónico fundamental.
2. Procesos no radiativos, en los que la población del estado inicialmente excitado se transfiere a otro estado sin que le acompañe ninguna emisión.
3. Procesos de apagamiento, que son procesos de deexcitación que implican la transferencia de energía de la molécula inicialmente excitada a otras partículas o moléculas mediante choques inelásticos.

Se pueden distinguir dos tipos de transiciones radiativas: la fluorescencia y la fosforescencia.

La fluorescencia implica la emisión radiativa desde un estado excitado de igual multiplicidad que el estado inferior de la transición. Generalmente en las moléculas orgánicas, esta transición se produce desde el estado excitado singulete de menor energía, S_1, hasta el estado fundamental S_o, por lo que se habla de una transición $S_1 \rightarrow S_o$. Debido a que no se produce un cambio en la multiplicidad del estado, esta transición está permitida por el espín, de forma que, en ausencia de otros factores de simetría, la emisión fluorescente esta permitida por lo que habitualmente se produce de manera rápida, en el rango de los picosegundos a los nanosegundos.

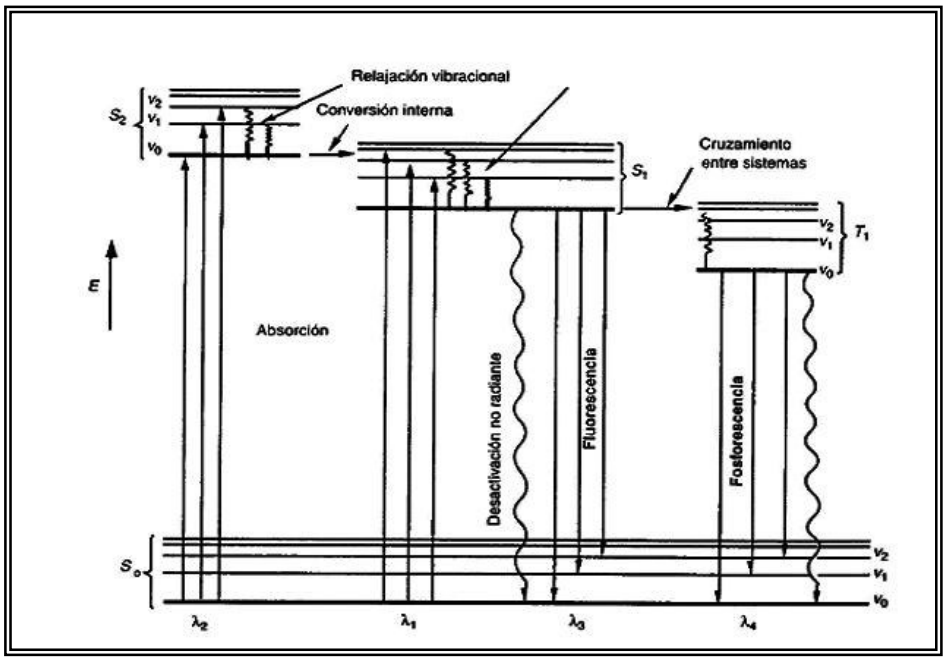
Por el contrario, si la multiplicidad de espín del estado que emite es diferente a la del estado inferior se produce la fosforescencia. De este modo, en el proceso de fosforescencia el estado triplete de menor energía es poblado, a menudo por un cruce entre sistemas desde el estado S_1, y a continuación se puede observar la transición $T_1 \rightarrow S_o$, o la fosforescencia.

Las relajaciones no radiativas implican el paso desde un estado electrónico a otro, sin que se produzca una emisión de radiación. Estrictamente hablando, todas las deexcitaciones que no emiten radiación son no radiativas. Sin embargo, se acostumbra a utilizar el término no radiativo para definir un proceso intramolecular, es decir, una transición que ocurre entre estados electrónicos de una molécula individual sin necesidad de perturbaciones externas como colisiones con otras partículas. En el diagrama de Jablonski (figura 1), las transiciones radiativas se representan con trazos verticales mientras que las transiciones no radiativas con trazos horizontales (conversión interna y cruzamiento entre sistemas), ya que estas últimas ocurren entre estados electrónicos que se encuentran muy próximos energéticamente. En forma similar a deexcitaciones radiativas, se pueden identificar dos tipos de deexcitaciones no radiativas, según las multiplicidades de espín de los estados implicados:

1. La conversión interna, que describe procesos intramoleculares por los cuales una molécula pasa a un estado electrónico de más baja energía sin emisión de radiación. Esta conversión interna parece ser particularmente eficaz cuando dos niveles de energía electrónicos están suficientemente próximos para que haya un solapamiento de los niveles de energía vibracional y es normalmente más probable que la pérdida de energía por fluorescencia desde un estado excitado más alto. La conversión interna puede conducir al fenómeno de la predisociación. En este caso, el electrón va desde un estado electrónico más alto a un nivel vibracional elevado del estado electrónico más bajo en el que la energía vibracional es lo suficientemente grande como para provocar la ruptura de un enlace.

2. El cruzamiento entre sistemas ocurre entre estados singulete y triplete cuando hay solapamiento de niveles de energía; durante este proceso, el espín de un electrón excitado se invierte dando lugar a un cambio en la multiplicidad de la molécula.[1]

Figura 1. *Diagrama de energía de Jablonski: descripción esquemática de los diferentes procesos fotofísicos que pueden tener lugar tras la excitación inicial desde el estado fundamental*



Por último, en los procesos de apagamiento se encuentra la relajación vibracional y la conversión externa. La primera esquematizada en el diagrama de Jablonski con una línea espiral, ocurre en una molécula ya que ésta, puede sufrir una transición a uno cualquiera de los muchos estados vibracionales más bajos dentro del mismo estado electrónico excitado como consecuencia de los choques entre las moléculas excitadas y el disolvente. Este proceso es tan efectivo, que el tiempo de vida media de una molécula excitada vibracionalmente es de 10^{-14}-10^{-11}s, período que es significativamente más corto que el tiempo de vida media del estado electrónico excitado.

La conversión externa, involucra procesos de interacción y transferencia de energía entre las moléculas excitadas y el disolvente u otros solutos. Los detalles de estos procesos son complejos y las transiciones no radiativas al estado fundamental desde los estados excitados singulete y triplete más bajos implican probablemente conversiones externas al igual que conversiones internas. En

disolución, el exceso de energía vibracional se pierde inmediatamente como consecuencia de las colisiones entre las moléculas de las especies excitadas y las del disolvente; el resultado de esto, es una transferencia de energía y un pequeño aumento de la temperatura del disolvente.

1.2 FLUORESCENCIA

La emisión de radiación electromagnética de un sistema excitado por absorción de energía de la misma naturaleza (radiación electromagnética), es llamada generalmente fluorescencia. La fluorescencia tiene lugar en sistemas químicos gaseosos, líquidos y sólidos tanto simples como complejos. El tipo más simple de fluorescencia es la que presentan los vapores atómicos diluidos. Las especies atómicas, generalmente, reemiten la radiación sin ningún cambio en la frecuencia de ésta, este tipo de fluorescencia se conoce como fluorescencia resonante o radiación de resonancia.

La espectroscopia de Fluorescencia es una técnica versátil y sensible para la identificación y cuantificación de numerosos compuestos de importancia en diferentes campos. Es una herramienta importante y se ha usado con alta exactitud en ciencias analíticas, del medio ambiente, biotecnología y ciencias biomédicas, incluyendo diagnóstico médico, secuenciación del ADN, análisis genético, entre otros.

1.2.1 Características de la emisión de fluorescencia

La fluorescencia habitualmente exhibe varias características generales, aunque se conocen excepciones:

1. *Desplazamiento Stokes*. El examen del diagrama de Jablonski (figura 1) revela que la energía de la emisión generalmente es menor que la de absorción. De aquí

que la señal de fluorescencia se observe a menores energías. La pérdida de energía entre la excitación y la emisión es observada universalmente para moléculas fluorescentes en solución. Una causa común del desplazamiento Stokes, es la rápida relajación vibracional en el estado excitado que lo lleva a niveles vibracionales mas bajos del estado electrónico excitado. Además, los fluoróforos generalmente decaen a niveles vibraciónales elevados del estado fundamental, generando pérdidas de energía adicionales. Además de estos efectos, los fluoróforos pueden exhibir desplazamientos Stokes debido a efectos del solvente, reacciones en el estado excitado, formación de complejos y por transferencia de energía.

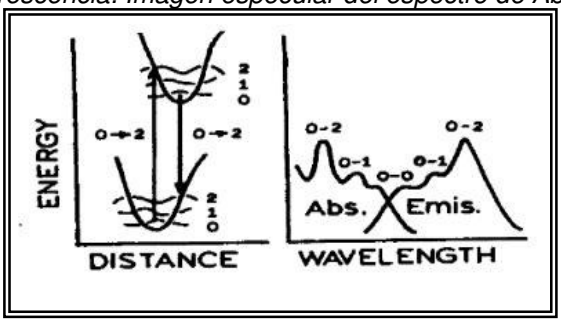
2. *El espectro de emisión frecuentemente es independiente de la longitud de onda de excitación, a condición de que la frecuencia de excitación este en el rango de absorción de la molécula*. Cuando la excitación se realiza a niveles electrónicos y vibraciónales elevados el exceso de energía es rápidamente disipado, llevando al fluoróforo al nivel vibracional mas bajo del estado del primer estado electrónico excitado S_1. Debido a esta rápida relajación el espectro de emisión usualmente es independiente de la longitud de onda de excitación.

Existen excepciones: fluoróforos que existen en dos estados excitados de ionización y cada uno de ellos exhibe un espectro distinto de absorción y emisión; también, algunas moléculas son conocidas por emitir desde niveles S_2, pero estas emisiones son raras y generalmente se observan en moléculas biológicas.

3. *Imagen especular*. Una consecuencia interesante del regreso a niveles vibracionales elevados del estado electrónico fundamental en la fluorescencia, es que el espectro de emisión generalmente es una imagen especular del espectro de absorción. Se observan estas semejanzas, por que en principio la excitación electrónica no altera significativamente la geometría, por tanto el espaciamiento de

los niveles de energía vibracional del estado excitado son similares a los del estado fundamental (figura 2).

Figura 2. *Espectro de fluorescencia: Imagen especular del espectro de Absorción*



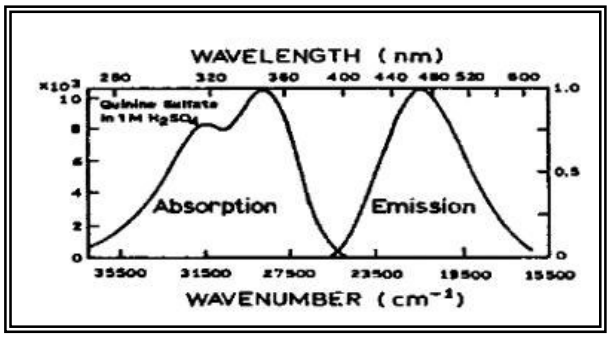
Fuente: LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy

El principio de Franck-Condon se fundamenta en el hecho de que la masa de un núcleo es mucho mayor que la de un electrón, por tanto, una transición electrónica es mucho mas rápida que la respuesta de los núcleos. Es decir, cuando se produce una transición electrónica los núcleos tienden a permanecer en su posición durante la transición. Suponiendo que inicialmente la molécula esta en el estado vibracional fundamental del estado electrónico mas bajo, los núcleos oscilan en torno a su posición de equilibrio. El principio de Frack-Condon dice que si en esta situación se produce una absorción de radiación que excite a la molécula a un estado electrónico superior, el sistema irá a un estado vibracional tal que tenga alta probabilidad de encontrarse inicialmente en su posición de equilibrio; por esta razón, a estas transiciones se les suele denominar transiciones verticales. Entonces, si la absorción entre los niveles vibracionales 0 y 2 (caso de la figura 2) es la más probable, la transición reciproca es también la mas probable en emisión.

Aunque la regla de la imagen especular generalmente se cumple también existen varias excepciones; por ejemplo, en algunos casos el espectro de emisión exhibe menos picos que el de absorción, debido a excitación de niveles electrónicos

superiores, donde las partículas rápidamente se relajan y dan lugar a emisión desde el nivel electrónico excitado más bajo, a pesar de que la absorción ocurrió en niveles más altos (figura 3).

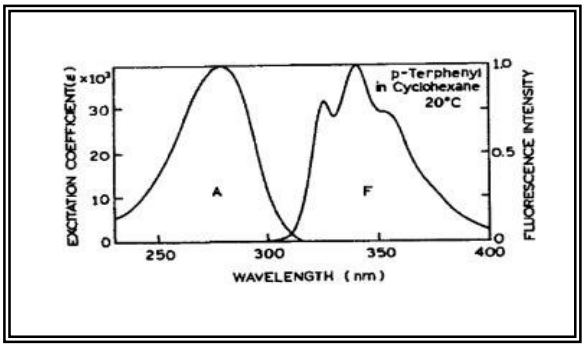
Figura 3.*Espectros de absorción y emisión de sulfato de Quinina. Excepción de la regla de la imagen especular*



Fuente: LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy

Otro ejemplo es el caso en que la emisión muestra estructura vibracional, mientras que el espectro de absorción carece de ella. Tal desviación de la regla de la imagen especular indica una disposición geométrica diferente del núcleo en el estado excitado comparada con el estado fundamental. Los desplazamientos nucleares pueden ocurrir antes de la emisión debido a los relativamente largos tiempos de vida del estado S_1, lo cual da la posibilidad y tiempo para el desplazamiento (figura 4). Este caso es inusual y generalmente se observa lo contrario.

Figura 4*. Espectros de absorción y emisión de p-terfenilo. Excepción de la regla de la imagen especular*



Fuente: LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy

Además de rearreglos geométricos pueden encontrarse también otras reacciones en el estado excitado que den lugar a desviaciones en la regla de la imagen especular o simetría de espejo; ejemplo de esto, es la formación de complejos de transferencia de carga, algunos fluoróforos pueden formar complejos con ellos mismos; además, pueden ocurrir otros procesos que desplacen el espectro de emisión y que pueden cambiar su perfil.[2]

1.2.2. Variables que afectan la fluorescencia

La estructura molecular y el entorno químico son factores que determinan si una sustancia es o no fluorescente, estos factores también afectan la intensidad de la fluorescencia.

1. *Tipo de transición.* Es importante resaltar que la fluorescencia rara vez es consecuencia de la absorción de radiación ultravioleta de longitud de onda menor de 250 nm, ya que tal radiación es suficientemente energética como para producir la desactivación de los estados excitados por predisociación o disociación. Una radiación de 200 nm corresponde aproximadamente a 600 kJ/mol; la mayoría de las moléculas tienen al menos algún enlace que se puede romper por energías de esta magnitud. Como consecuencia, rara vez se observa fluorescencia debida a transiciones $\sigma^* \rightarrow \sigma$, en cambio, este tipo de emisión esta asociada a los procesos menos energéticos $\pi^* \rightarrow \pi$ y $\pi^* \rightarrow n$, dependiendo de cual de ellas sea menos energética.

2. *Eficiencia cuántica y tipo de transición*. Empíricamente se observa que el comportamiento fluorescente lo presentan con mas frecuencia compuestos en los que la transición de mas baja energía es del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y no aquellos compuestos en los que la transición de menor energía es del tipo $n \rightarrow \pi^*$; esto es, la eficiencia cuántica es mayor para transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$.

La mayor eficiencia cuántica asociada a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se puede explicar de dos maneras. Primero, la absortividad molar de una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es normalmente 100 a 1000 veces superior que para un proceso $n \rightarrow \pi^*$ y esta cantidad representa una medida de la probabilidad de transiciones en cada dirección. Así, el tiempo de vida media inherente asociado con una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es mas corto (10^{-7} a 10^{-9}s comparado con 10^{-5} a 10^{-7}s para una transición $n \rightarrow \pi^*$).

También se cree que la constante de velocidad para el cruzamiento entre sistemas es mas pequeña para transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, ya que la diferencia entre los estados singulete-triplete es mayor; esto es, se requiere mas energía para desaparear los electrones del estado excitado π^*. Como consecuencia, el solapamiento de los niveles vibracionales del triplete con los del estado singulete es menor y la probabilidad de que ocurra un cruce entre sistemas es menor.

En resumen, la fluorescencia está más asociada con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, ya que tales transiciones presentan tiempos de vida mas cortos (k_f es mayor) y porque es menos probable que tengan lugar los procesos de desactivación que compiten con la fluorescencia.

3. *Estructura*. La fluorescencia mas intensa y la mas útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de mas baja energía. La fluorescencia, por lo general, se presenta en moléculas aromáticas o que contengan varios enlaces dobles conjugados con un alto grado de estabilidad de resonancia, aunque los sustituyentes pueden alterar notablemente el grado de fluorescencia. La mayoría de hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en solución, la eficiencia cuántica normalmente aumenta con el número de anillos y con su grado de condensación.

La sustitución en el anillo bencénico provoca desplazamiento en la longitud de onda de los máximos de absorción y los correspondientes cambios en los picos fluorescentes. Además la sustitución afecta frecuentemente la eficiencia de la fluorescencia; un sustituyente que deslocalice los electrones π, tales como NH_2, OH, F, OCH_3, $NHCH_3$ Y $N(CH_3)_3$, tiende a aumentar la fluorescencia, mientras que los que contienen Cl, Br, I, $NHCOCH_3$, NO_2 o COOH actúan disminuyendo la fluorescencia y en ocasiones la suprimen.

4. *Efecto de la rigidez estructural*. Empíricamente se encuentra que la fluorescencia se ve particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. La falta de rigidez de una molécula probablemente provoca un aumento de la velocidad de conversión interna y el correspondiente aumento en la probabilidad de desactivación no radiante. Una parte de una molécula no rígida puede sufrir vibraciones de baja frecuencia con respecto a sus otras partes y tales movimientos indudablemente explican ciertas pérdidas de energía.

5. *Efecto de la temperatura y del disolvente*. El rendimiento cuántico de la fluorescencia disminuye en la mayoría de las moléculas al aumentar la temperatura, ya que crece el número de colisiones y por ende aumenta la probabilidad de desactivación por conversión externa. Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de la conversión externa y conduce al mismo resultado.

6. *Efecto del pH en la fluorescencia*. Los cambios en el pH del sistema también afectan la fluorescencia, siempre y cuando dichos cambios influyan en el estado de carga del fluoróforo. La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de la emisión son, probablemente diferentes para las formas ionizada y no ionizada del compuesto.

7. *Efecto del oxígeno disuelto*. La presencia de oxígeno disuelto suele reducir la intensidad de la fluorescencia de una disolución. Este efecto puede ser el resultado de una oxidación de las especies fluorescentes inducida fotoquímicamente. Sin embargo, con más frecuencia el apagamiento tiene lugar como consecuencia de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular, que favorecen el cruce entre sistemas y la conversión de las moléculas excitadas al estado triplete.[1]

1.2.3. Tiempo de vida media y rendimiento cuántico

El tiempo de vida media y el rendimiento cuántico son quizás las características mas importantes de la fluorescencia. El rendimiento cuántico, también llamado eficiencia cuántica de la fluorescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten luminiscencia y el número total de moléculas excitadas.

Teniendo en cuenta los mecanismos de disipación, es evidente que el rendimiento cuántico de la fluorescencia (Q_o) para un compuesto se puede calcular a partir de las constantes de velocidad relativas de los procesos por los cuales la molécula se desactiva: fluorescencia (k_f), cruzamiento entre sistemas (k_i), conversión externa (k_{ec}), conversión interna (k_{ic}), predisociación (k_{pd}) o procesos de apagamiento (k_q); así, el rendimiento cuántico de un fluoróforo refleja una competencia entre la emisión de un fotón y los procesos no radiativos donde para simplificar se utiliza k_{nr} para referirse a los procesos no radiativos:

$$Q_o = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ec} + k_{ic} + k_{pd} + k_q} = \frac{k_f}{k_f + k_{nr} + k_q} \quad \textit{(Ecuación 1)}$$

El tiempo de vida media de la fluorescencia (τ_o), también llamado tiempo de decaimiento, corresponde a una medida estadística del tiempo durante el cual un fluoróforo permanece en el estado excitado y se define como:

$$\tau_o = \frac{1}{k_f + k_{nr} + k_q} \qquad \textit{(Ecuación 2)}$$

Las interacciones de los fluoróforos con el ambiente externo pueden afectar los procesos de decaimiento discutidos anteriormente; así mismo, la intensidad y el tiempo de vida de la fluorescencia son fuertemente influenciadas por el ambiente inmediato del fluoróforo.

Normalmente, es difícil cambiar la constante de velocidad de la fluorescencia k_f; por esta razón, los procedimientos convencionales recurren a la modificación de la constante de velocidad de decaimiento no radiativo, k_{nr} y/o la constante de velocidad de procesos de apagamiento k_q (donde se involucran procesos intermoleculares que eliminan la fluorescencia) para obtener mejores rendimientos cuánticos. Por ejemplo, moléculas que en condiciones normales presentan bajo rendimiento cuántico, podrían presentar alto rendimiento cuántico y tiempos de vida más largos en soluciones congeladas o cuando están enlazadas a macromoléculas. Así, el rendimiento cuántico es tanto mayor cuanto más elevada sea la constante de velocidad de la fluorescencia y el valor límite correspondería a Q=1, cuando $k_{nr}+k_q$ sea infinitamente menor que k_f[3,4].

1.2.4. Fluorescencia inducida por láser (LIF)

Se entiende por fluorescencia inducida por láser, LIF (Láser Induced Fluorescence), la emisión espontánea de átomos y moléculas que han sido excitados por radiación láser. En el caso de la fluorescencia molecular la anchura de las bandas de absorción reduce la importancia de la monocromaticidad del

láser. Por la misma razón la longitud de onda de excitación no tiene que coincidir estrictamente con una transición en particular. En 1971 se utilizo por primera vez el láser en análisis de fluorescencia molecular. Jankow et. al. emplearon un láser de He-Cd comercial como fuente de excitación en medidas de polarización, determinación del espectro de emisión y determinación de los límites de detección ($2*10^{-13}$ M) del bisulfato de quinina. Ese mismo año Measure y Bristol usaron un doblador de frecuencia y un láser de Rubí para obtener espectros de fluorescencia del agua, películas de aceite y muestras de rocas.

Como fuentes de excitación en fluorescencia molecular, han sido empleados láseres de colorantes pulsados y láseres continuos. La selección de una de estas dos clases esta influenciada por el objetivo de la investigación. Además, si el instrumento va a ser usado en la obtención del espectro de excitación, se debe considerar un sistema pulsado o continuo sintonizable, debido al ancho rango espectral que puede cubrir este tipo de láseres. [5]

Con láseres de tipo pulsado, se han realizado muchos estudios en los cuales se han utilizado láseres de nitrógeno, láseres de colorantes bombeados con láseres de nitrógeno y con doblador de frecuencias y láseres de Nd-YAG. Con láseres continuos, se han realizado estudios utilizando láseres de He-Cd (352 y 442 nm), de colorantes sintonizables y de ion argón, con líneas principales en 457 y 515 nm. Actualmente ganan en importancia los láseres sintonizables bombeados con láser de diodos (estado sólido).

1.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico indio Chandrasekhara Venkata Raman en el año 1928, trabajo por el cual obtuvo el premio Nóbel de física en 1930. Este científico dio nombre al fenómeno de

dispersión inelástica de la luz que permite el estudio de rotaciones y vibraciones moleculares. La dispersión es la desviación de luz de su dirección original de incidencia.

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de compuestos orgánicos y/o inorgánicos permitiendo así su identificación. Se trata de una técnica que se puede realizar directamente sobre el material a analizar sin necesidad de preparación especial y sin alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no destructiva; además, los desplazamientos Raman son independientes de la longitud de onda de excitación.

1.3.1. Breve descripción del efecto Raman

El efecto de dispersión Raman surge a partir de la interacción de la luz incidente con las moléculas iluminadas. Puede ocurrir dispersión Raman aún si la energía de la luz incidente no es suficiente para excitar la molécula a un nivel electrónico de mayor energía. En este caso el resultado de la dispersión Raman es cambiar el estado vibracional o rotacional de la molécula y el efecto se conoce como Raman normal.

Cuando sobre la molécula inciden fotones con energía hv_o que no coincide con la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales (o rotacionales) de la molécula, la mayor parte la atraviesan pero una pequeña fracción es dispersada (del orden de 1 fotón dispersado por cada 10^{11} incidentes). La interacción del vector de campo eléctrico de una onda electromagnética con el sistema da lugar a la dispersión de la luz incidente. Tales interacciones inducen oscilaciones periódicas de la molécula y generan momentos eléctricos oscilantes. De esta manera la molécula se convierte en una nueva fuente emisora, es decir, la luz es

dispersada isotrópicamente. Es a la radiación dispersada inelásticamente a la que se le llama señal Raman.

Como una primera aproximación en el tratamiento de la dispersión Raman, se encuentra el modelo clásico[6], para el caso de una molécula diatómica. Se considera un haz de radiación de frecuencia v_0 que incide sobre una solución de analito; el campo eléctrico de esta radiación se puede describir por la ecuación:

$$E = E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \qquad \textit{(Ecuación 3)}$$

donde E_0 es la amplitud de la onda. Cuando se ilumina a una molécula diatómica con esta radiación, se induce un momento dipolar eléctrico P dado por:

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \qquad \textit{(Ecuación 4)}$$

en donde α es la polarizabilidad de la molécula, que representa la medida de la deformabilidad del enlace cuando se encuentra en un campo eléctrico. Para que un enlace sea Raman activo, la polarizabilidad α ha de variar en función de la distancia entre los núcleos, de acuerdo con la ecuación:

$$\alpha = \alpha_0 + (r - r_{eq})\left(\frac{\partial \alpha}{\partial r}\right) \qquad \textit{(Ecuación 5)}$$

donde α_0 es la polarizabilidad del enlace a una distancia internuclear de equilibrio r_{eq} y $(d\alpha/dr)$ es el cambio de α con respecto al cambio en r, evaluado en la posición de equilibrio. El cambio en la separación internuclear varía con la frecuencia de la vibración v_v, y está dado por:

$$r - r_{eq} = r_m \cos(2\pi \nu_v t) \qquad \textit{(Ecuación 6)}$$

donde r_m es la separación internuclear máxima en relación con la posición de equilibrio. De esta forma el momento dipolar es:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right)\cos[2\pi(\nu_0 - \nu_\nu)t] + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right)\cos[2\pi(\nu_0 + \nu_\nu)t]$$

(Ecuación 7)

El primer término de la ecuación 7, representa un dipolo oscilante que emite luz de frecuencia v_0, correspondiente a la dispersión Rayleigh, el segundo y el tercero contienen respectivamente los términos correspondientes a la dispersión Raman anti-Stokes de frecuencia v_0+v_k y a la dispersión Raman Stokes de frecuencia v_0-v_k.

Estas dispersiones pueden ser interpretadas así: el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional (o rotacional) no permitido, del cual sale rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón; la frecuencia del fotón liberado dependerá del salto energético realizado por la molécula.

- Dispersión Rayleigh. En este caso, el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia v_o que el fotón incidente, se dice que el choque es elástico ya que ni el fotón ni la molécula sufren variaciones en su estado energético; la molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque.

- Si el resultado de la interacción es un fotón dispersado a una frecuencia distinta a la incidente, se dice que el choque es inelástico (existe transferencia de energía entre la molécula y el fotón); en este caso pueden darse dos fenómenos:
  - Dispersión Raman Stokes. En este caso, el fotón dispersado tiene una frecuencia menor que la del incidente, v_o-v_k. Se trata de transferencia de

energía del fotón a la molécula que, después de saltar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente.

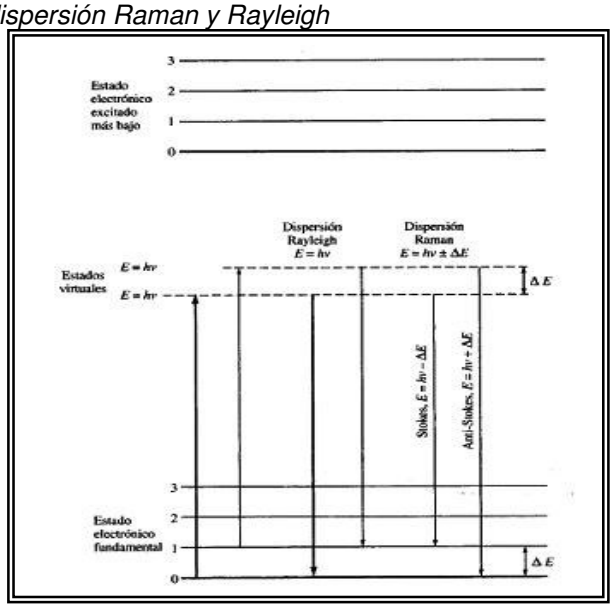
- Dispersión Raman anti-Stokes. En este caso, el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente, v_o+v_k. Se trata de transferencia de energía de la molécula al fotón; en este caso la molécula, inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado.

La figura 5 proporciona una visión cualitativa del proceso de dispersión Raman. La flecha gruesa de la izquierda representa el cambio de energía de la molécula cuando interacciona con un fotón de la fuente. El aumento de energía es igual a la energía del fotón hv_o. Es importante apreciar que el proceso indicado no es cuantizado; y por tanto, la molécula puede ocupar cualquiera de los estados virtuales correspondientes a la frecuencia de la fuente.

La segunda flecha, más fina, muestra el tipo de cambio que ocurriría si la molécula alcanzada por el fotón estuviera en el primer nivel vibracional del estado electrónico fundamental. Las flechas centrales representan los cambios que originan la dispersión Rayleigh. El cambio más probable se indica por una flecha más gruesa.

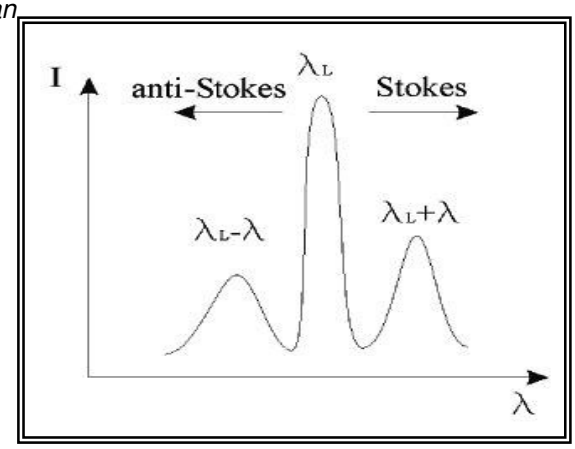
Por último, en la parte derecha se representan los cambios de energía que producen la emisión Stokes y anti-Stokes, sus frecuencias corresponden a la suma y diferencia de las frecuencias de la luz incidente y las frecuencias vibracionales moleculares permitidas. De aquí, que un espectro Raman típico luzca como el expuesto en la figura 6, en donde se indica los desplazamientos Rayleigh, Stokes y anti-Stokes.

Figura 5. *Origen de la dispersión Raman y Rayleigh*



Fuente: SKOOG, D. A. and LEARY, J.J. Análisis Instrumental

Figura 6. *Espectro Raman*



A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzman, la mayor parte de las moléculas se encuentra en el estado vibracional de menor energía, y por tanto, la probabilidad de que ocurran transferencias de energía que den lugar a la dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la dispersión Raman anti-Stokes. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior a la de la dispersión Raman anti-Stokes. La diferencia entre la intensidad de estos dos efectos hace que habitualmente se trabaje midiendo sólo el efecto Stokes.

En ocasiones, debido a la naturaleza química del material que se analiza, además del efecto Raman se produce fluorescencia que puede llegar a solapar u ocultar las señales Raman Stokes al punto que no son observables en condiciones experimentales ordinarias; en estos casos, podría resultar de interés medir las señales anti-Stokes ya que a estas frecuencias, aunque el efecto Raman es débil, también lo es la fluorescencia, o usar láseres con longitudes de onda de excitación que estén fuera del intervalo de absorción de la molécula fluorescente.

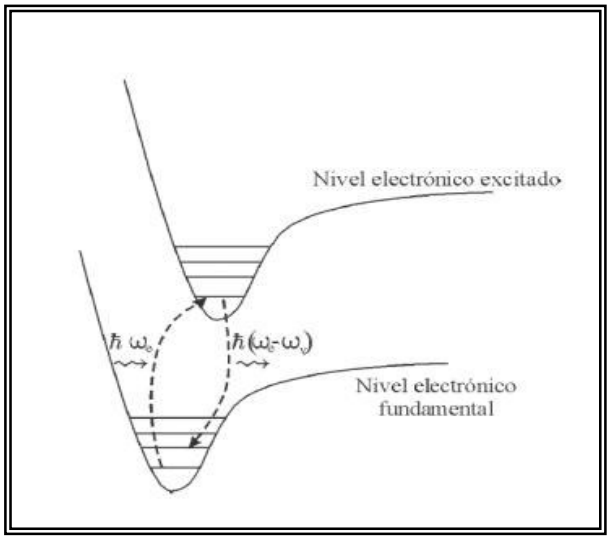
1.3.2. Raman resonante

El caso en el cual la radiación incidente coincide con una transición electrónica, se conoce como Raman Resonante (RR). Bajo esta condición, la magnitud de los picos Raman aumentan por un factor de 10^2 a 10^6. Como consecuencia, se han podido obtener espectros Raman de resonancia con concentraciones muy bajas de analito comparadas con las obtenidas en espectros Raman normales. La figura 7 ilustra los cambios de energía responsables de la dispersión Raman resonante.

El proceso RR ocurre en menos de 10^{-14}s. La intensidad de las líneas en estos experimentos aumenta cuando la longitud de onda de excitación es muy cercana al máximo de absorción del analito. Así, para conseguir el mayor incremento de señal en un intervalo ancho de máximos de absorción, se utiliza normalmente un láser sintonizable.[1,2]

La principal limitación de la espectroscopía raman resonante radica en la interferencia causada por la fluorescencia del propio analito o de otras especies presentes en la muestra.

Figura 7. *Diagrama de energía para la dispersión Raman de resonancia*



Fuente: SKOOG, D. A. and LEARY, J.J. Análisis Instrumental

1.4. EFECTOS DE LAS SUPERFICIES SOBRE LOS FENOMENOS FOTOFISICOS

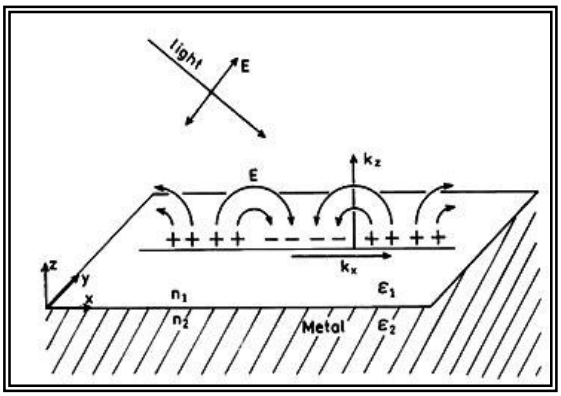
Tanto el proceso de fluorescencia como el proceso Raman son influenciados de manera muy interesante por efecto de interacciones con superficies metálicas con nanoestructuras periódicas. Estos efectos dan lugar a los fenómenos conocidos como Fluorescencia intensificada por efecto superficial y dispersión Raman intensificada por efecto superficial.

1.4.1. PLASMONES SUPERFICIALES

Se conoce como plasmones superficiales a las oscilaciones colectivas de un grupo de electrones de conducción de un metal. El termino plasmón, indica que los electrones pueden migrar libremente en el metal, de manera similar a los iones en un plasmón gaseoso. Los plasmones superficiales pueden aparecer sobre superficies o en partículas metálicas.

La figura 8 ilustra los plasmones superficiales en una superficie metálica plana; estos, pueden ser inducidos por iluminación de la superficie con luz p-polarizada, sin embargo, son inducidos solo bajo condiciones ópticas especiales. La creación de plasmones superficiales en superficies planas, requiere la iluminación de una película metálica delgada a través de un prisma o algún material con constante dieléctrica más alta[7].

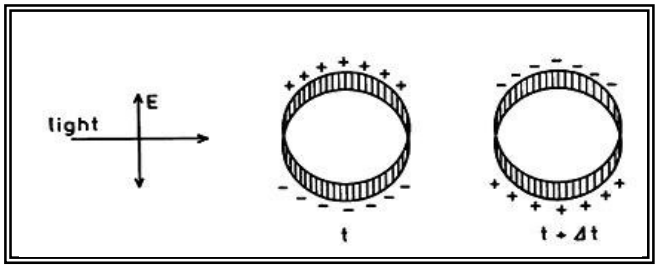
Figura 8. *Plasmones superficiales en una superficie metálica plana.*



Fuente: LAKOWICZ, J.R. Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission

Los plasmones también son creados por iluminación directa de nanoestructuras o coloides metálicos (figura 9). Los coloides a diferencia de las superficies metálicas planas no requieren de condiciones especiales para generar los plasmones superficiales[7].

Figura 9. *Plasmones superficiales en coloides*



Fuente: LAKOWICZ, J.R. Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission

Las teorías que describen estas interacciones no son simples, hay un buen número de ellas, desde modelos clásicos hasta descripciones mecánico cuánticas complejas. Estas teorías incluyen desde luego modelos teóricos usados para describir las propiedades superficiales de los metales.

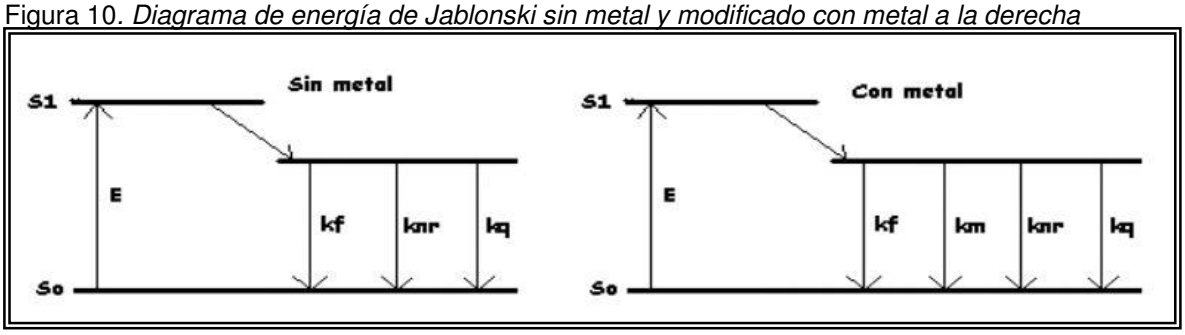
1.4.2. Fluorescencia Intensificada por efecto superficial.

El uso de nanoestructuras metálicas en fluorescencia tiene sus orígenes históricos en los reportes clásicos de Drexhage en 1974, quien en su trabajo demostró la posibilidad de alterar la velocidad de decaimiento radiativo mediante la medida del tiempo de decaimiento de un complejo de Europio colocado a diferentes distancias de una superficie plana metálica (un espejo o película delgada); el resultado de esto, fue la observación de variaciones del tiempo de vida emisiva con la distancia desde la superficie metálica.[7,8]

Aunque los primeros reportes experimentales y teóricos sobre este fenómeno se encuentran en los años 70 y 80, la mayor parte del trabajo que se reporta en la literatura corresponde a los últimos años; en donde se han estudiado intensamente los efectos de la presencia de superficies metálicas microestructuradas que interaccionan con los fluoróforos durante los procesos de fluorescencia. Estas interacciones están estrechamente relacionadas con el efecto de plasmones superficiales; el efecto se conoce como Fluorescencia Intensificada por Efecto superficial, SEF (Surface Enhanced Fluorescence).

Cuando un fluoróforo se coloca cerca de una partícula metálica, dependiendo del tamaño de las estructuras metálicas y de la distancia fluoróforo-partícula, puede exhibir un aumento en el rendimiento cuántico y una disminución del tiempo de vida media. El efecto superficial de los procesos de fluorescencia se esquematiza en el siguiente diagrama de Jablonski modificado (a la derecha) donde aparece una constante de velocidad radiativa inducida por el metal k_m.

Figura 10. *Diagrama de energía de Jablonski sin metal y modificado con metal a la derecha*



Fuente: LAKOWICZ, J.R. et al. Intensified Fluorescence

Debido a la aparición de k_m, las moléculas débilmente fluorescentes podrían llegar a ser fuertemente fluorescentes mientras que el tiempo de vida decrece. Así, para un fluoróforo cercano a un metal el rendimiento cuántico y el tiempo de vida están dados por:

$$Q_m = \frac{k_f + k_m}{k_{f+} k_m + k_{nr} + k_q} \qquad \textit{(Ecuación 3)}$$

$$\tau_m = \frac{1}{k_f + k_m + k_{nr} + k_q} \qquad \textit{(Ecuación 4)}$$

Es decir, que al colocar un fluoróforo cerca de un metal este puede aumentar la constante de velocidad radiativa global debido a k_m, la cual incrementa el rendimiento cuántico y disminuye el tiempo de vida media. La teoría sugiere que la velocidad radiativa puede incrementarse en más de mil ordenes de magnitud cerca de un metal, incremento suficiente para cambiar una molécula con rendimiento cuántico cercano a cero a una cercana a la unidad.

La intensificación del campo eléctrico sobre el fluoróforo podría ser de un factor de 100 o más, para nanopartículas metálicas a distancias adecuadas; como consecuencia, es posible un incremento de diez mil ordenes en la intensidad del campo local.

La baja estabilidad del fluoróforo limita la detección de la fluorescencia; aún el fluoróforo más fotoestable se fotodegrada después de 10^5 a 10^6 ciclos de excitación-emisión. El grado de descomposición fotoquímica depende del tiempo que el fluoróforo permanezca en el estado excitado más reactivo. De aquí, que una disminución de 10 órdenes en el tiempo de vida media puede tener como consecuencia un aumento de 10 ordenes en el número de fotones que el fluoróforo emite antes de la descomposición y el correspondiente aumento en la fotoestabilidad.[10]

Existen dos fenómenos simultáneos que resultan en incremento de la señal de fluorescencia de moléculas sobre superficies metálicas: intensificación del campo local que incrementa la eficiencia de la excitación e incremento en la velocidad de decaimiento radiativo. Un aumento en la velocidad de decaimiento radiativo o una disminución en la velocidad de decaimiento no radiativo tiene como consecuencia un incremento en la intensidad; sin embargo, el primero es acompañado por una disminución del tiempo de vida de la fluorescencia el cual produce también un incremento de la fotoestabilidad de las moléculas sobre la superficie metálica, mientras que el último esta acompañado por un aumento en el tiempo de vida de la fluorescencia.

La señal SEF es el resultado de una delicada interacción de varios procesos, sin embargo, SEF es atribuido principalmente al campo electromagnético local. Cuando la radiación incidente interactúa con la superficie se generan oscilaciones en la densidad de electrones de conducción que dan lugar a los dipolos eléctricos ya mencionados como plasmones superficiales. Cuando la molécula está a una distancia óptima de la partícula metálica esta puede ser polarizada por este campo local y esto conduce a una intensificación de la señal, porque la señal de fluorescencia es proporcional al cuadrado del campo local. Así mismo, se obtienen intensificaciones adicionales como resultado de la reciprocidad de los fenómenos ópticos; así como el campo incidente puede polarizar la partícula metálica y puede

inducir un dipolo, el dipolo inducido puede polarizar la partícula cercana a él y puede crear un campo más grande.

La contribución a la señal podría ser separada en dos factores de intensificación electrodinámica $|A(\omega)|^2$ y $|A(\omega_o)|^2$, donde ω y ω_o, son las frecuencias incidente y emitida, respectivamente. Estos dos factores están completamente determinados por las resonancias plasmónicas superficiales. Existe un segundo grupo de factores que influyen, la sección transversal de absorción del fluoróforo modificada por la superficie, los canales de decaimiento no radiativo y el apagamiento inducido por la superficie.

Uno de los factores más importantes a considerar, para obtener experimentalmente el efecto SEF es la separación molécula-metal. Se ha comprobado que la máxima intensificación de la fluorescencia es obtenida a una distancia optima d; cálculos en modelos y resultados experimentales confirman esta predicción. Se reportan valores de d para intensificación máxima de fluorescencia de 25-100Å, aunque algunas publicaciones reportan distancias mayores de 100Å, hasta 600Å en donde aún se observa intensificación[10,11,12,13]. Si la distancia nanopartícula-fluoróforo es muy inferior a los valores reportados de d, se genera un efecto contrario, de apagamiento de la fluorescencia, el cual por otra parte podría favorecer la posibilidad de observar señales Raman en compuestos fluorescentes.

La generación de plasmones superficiales utilizables en estas interacciones depende de las características electro-ópticas de los metales. Son los metales de acuñación oro, plata y cobre los que han demostrado las mejores características de resonancia Plasmónica superficial.

El efecto SEF se ha estudiado sobre diversas superficies de plata y oro, que incluyen electrodos rugosos, coloides, películas islas, películas delgadas,

nanoalambres, nanobarras, nanoplacas triangulares, entre otros; métodos con los cuales se pretende una mayor versatilidad de la técnica y por ende un mayor número de aplicaciones que supla los requerimientos específicos.

La actividad de investigación alrededor de los efectos plasmónicos superficiales es muy intensa. Existe un gran interés en utilizar nanopartículas de oro y plata; estas partículas pueden preparase utilizando distintas estrategias que van desde métodos de la fisicoquímica coloidal a métodos litográficos y de ablación láser. Se han desarrollado tecnologías que permiten controlar las propiedades estructurales (forma tamaño, entorno químico, grado de agregación) en un amplio intervalo y con una gran precisión, lo cual abre la posibilidad de obtener materiales con propiedades electro-ópticas de acuerdo a las necesidades y funcionalizar fisicoquímicamente las nanopartículas, esto es, controlar la naturaleza química de la superficie lo que permite controlar la selectividad de las interacciones con las moléculas que se desee detectar. La combinación de estos procedimientos ha dado lugar a una nueva generación de aplicaciones químicas y biológicas de gran sensibilidad y en algunos casos mayor selectividad que las convencionales en la detección de moléculas de gran importancia para el diagnóstico médico, medio ambiente, identificación de contaminantes y otras aplicaciones de interés.

Estos efectos superficiales sobre el comportamiento de los fluoróforos abren interesantes posibilidades de aplicación en diferentes campos tales como: ciencias analíticas, del medio ambiente, biotecnología y ciencias biomédicas, entre otras. Algunas de las aplicaciones en desarrollo incluyen terapia genética, proyecto del genoma humano, sensores capaces de detectar rápidamente mutaciones asociadas con muchos tipos de cáncer[14], propiedades ópticas de tierras raras tales como Eu y Dy[15,16], monitoreo directo de procesos de reconocimiento moleculares, seguimiento del curso de reacciones biomoléculares entre ligando fluorescentes y sus receptores en tiempo real, así como también determinación de la cinética del enlace, la afinidad y la especificidad de las interacciones entre las

moléculas[17], intensificación selectiva de la emisión desde regiones localizadas de células o tejidos[18], desarrollo de sensores ópticos para iones metálicos, entre otras.

1.4.3. Dispersión Raman Intensificada por efecto superficial.

El efecto SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) fue detectado por primera vez en 1974 por Fleischmann y colaboradores[19] al intentar registrar el espectro Raman de piridina adsorbida sobre un electrodo de plata sometido a varios ciclos de oxidación-reducción, encontraron que el espectro era inusualmente intenso; desde entonces, se han realizado numerosos estudios teóricos y experimentales para explicar el efecto. En un primer momento se creyó que la intensificación Raman era debida al incremento del área superficial producida por el tratamiento de oxidación-reducción y que por tanto habría un mayor número de moléculas que interactuarían con la luz incidente; pero muy pronto se pudo demostrar que éste no podía ser el único efecto presente, y que estaba actuando un fenómeno nuevo y desconocido que dió lugar al nacimiento de la espectroscopía SERS.

A partir de entonces, se ha desarrollado intensa investigación sobre este fenómeno. Se ha encontrado que este efecto de las superficies metálicas sobre la dispersión Raman ha sido predicho teóricamente y es análogo al efecto de fluorescencia intensificada por efecto superficial, SEF.

La primera característica y más importante de SERS es la enorme intensificación del espectro Raman, de determinadas moléculas en presencia de nanoestructuras metálicas especialmente preparadas, cuya intensidad excede en un factor de 10^4 –10^6 del que se obtiene en ausencia de la superficie metálica.

Otra característica general es la marcada dependencia de la intensificación observada con respecto a la naturaleza del metal empleado y su morfología

superficial; además influye la naturaleza de la molécula a estudiar y gran número de variables experimentales como concentración, potencial de electrodo, etc. Para el caso de Raman resonante, el fenómeno de intensificación superficial se conoce como SERRS (Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering).

Finalmente, otra característica importante de SERS es que la intensificación no es uniforme sobre todas las líneas del espectro Raman, sino que ciertas bandas pueden ser más intensificadas que otras. Estas intensidades relativas del espectro SERS pueden llegar a ser muy diferentes del espectro Raman en ausencia del metal, esta intensificación selectiva es muy variable para una misma molécula, dependiendo de las condiciones particulares de cada registro. La intensificación selectiva es muy importante ya que está íntimamente relacionada con el mecanismo encargado de la intensificación.

Una vez reconocido SERS como un nuevo fenómeno, se empezaron a proponer diferentes explicaciones encaminadas a explicar su origen. A inicios de los años 80 ya se habían publicado los fundamentos de distintos mecanismos de diferente naturaleza. Aunque se han propuesto una gran cantidad de mecanismos y múltiples variantes de cada uno de ellos, hoy se acepta que hay dos principales contribuciones al fenómeno SERS: el mecanismo de intensificación electromagnético (EM) y el llamado mecanismo de transferencia de carga (CT) o mecanismo químico. Los indicios experimentales indican a que ambos se dan en algunos casos simultáneamente, aunque sigue siendo muy difícil establecer la contribución de cada uno de ellos en el factor de intensificación total.[20]

El mecanismo electromagnético es el considerado el mayor responsable de la intensificación SERS y se basa en la generación de plasmones superficiales que dan lugar a una fuerte amplificación del campo electromagnético incidente en las nanoestructuras de la superficie.

Un modelo EM simplificado considera la intensificación de la señal Raman cuando una radiación de frecuencia ω_o incide sobre una partícula esférica o esferoidal aislada. Es lo que se conoce como modelo de la esfera metálica y constituye la aproximación más simple al estudio teórico de estos sistemas. Básicamente, la enorme intensificación que experimenta la radiación Raman se debe a dos procesos fundamentales: a) por una parte, se produce un considerable aumento de la intensidad del campo electromagnético incidente total que llega a la molécula, situada en posición **r'**; ya que este campo está compuesto, no solamente de la radiación que incide directamente en la molécula, $\mathbf{E_i(r', \omega_o)}$, sino también del campo que, a la misma frecuencia, es dispersado por el propio metal, $\mathbf{E_{LM}(r',\omega_o)}$, el cual fue descrito por Mie.

El campo dispersado por la partícula metálica resulta ser muchísimo más grande cuando la frecuencia ω_o se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal. Por tanto, el campo eléctrico total $\mathbf{E_l}$ de frecuencia ω_o que incide sobre la molécula en **r'** será:

$$\mathbf{E_l\ (\ r',\ \omega_o) = E_i(r',\ \omega_o) + E_{LM}(r',\ \omega_O)} \qquad \textit{(Ecuación 5)}$$

Por otra parte, el campo eléctrico asociado con la radiación Raman, de frecuencia ω_R, sufre también una amplificación similar a la del campo incidente. El campo eléctrico total dispersado, de frecuencia ω_R, que se observa en la posición **r**, es una composición del dispersado directamente por la molécula, $\mathbf{E_d(r,\ \omega_R)}$, y el campo dispersado por la partícula metálica cuando son excitados los plasmones superficiales con una frecuencia ω_R, $\mathbf{E_{DM}(r,\ \omega_R)}$. Por lo tanto, el campo eléctrico total dispersado, $\mathbf{E_R(r,\ \omega_R)}$, será:

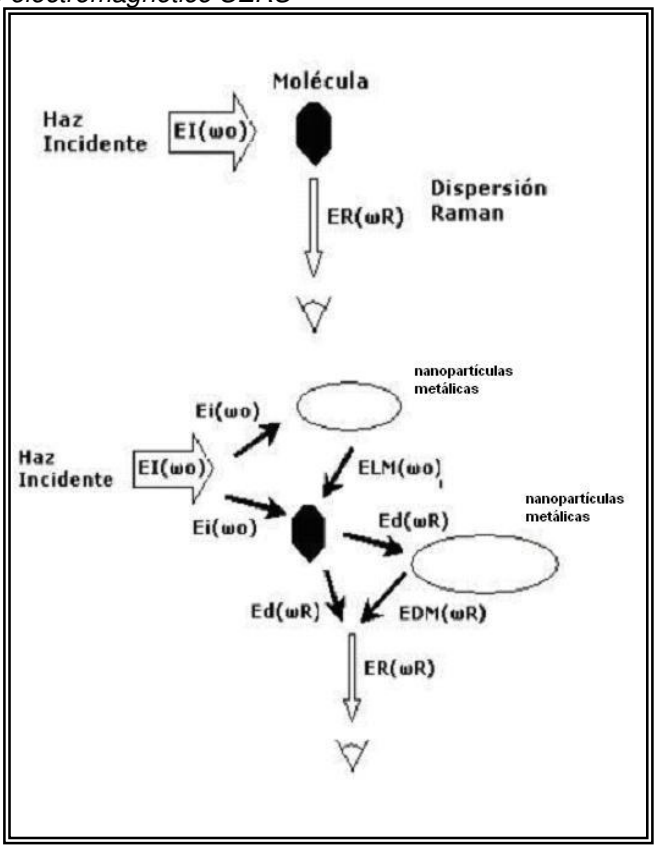
$$\mathbf{E_R(r,\ \omega_R) = E_d(r,\ \omega_R) + E_{DM}(r,\ \omega_R)} \qquad \textit{(Ecuación 6)}$$

A partir del campo $\mathbf{E_R(r, \omega_R)}$ se puede calcular la intensidad de campo eléctrico dispersado inelásticamente, $\mathbf{I_R}$, en el punto **r**. Si $\mathbf{I_R^o}$ es el valor de esta intensidad en ausencia de metal, puede, entonces, definirse un factor de intensificación **G** de la siguiente forma:

$$\mathbf{G} = \frac{I_R}{I_R^o} \qquad \textit{(Ecuación 7)}$$

El valor de **G** depende del tamaño de la partícula, de la distancia a la superficie, **r**, y de las constantes dieléctricas del metal, $\boldsymbol{\varepsilon(\omega)}$ y del medio que lo rodea, $\boldsymbol{\varepsilon_o}$. Se reportan valores de r para intensificación de Raman de 20-30Å[21,22,23]

Figura 11. *Mecanismo electromagnético SERS*



Fuente: GARCIA-RAMOS, J.V. Mecanismo electromagnético del efecto SERS

Es importante destacar la diferencia de acción de la distancia fluoróforo-partícula para SEF y para SERS; en el caso de SEF, a cortas distancias se produce apagamiento de la fluorescencia, aquí es necesario el control de la distancia para obtener intensificación; en cambio para SERS, a cortas distancias es muy favorable ya que permite la acción de los dos mecanismos de intensificación responsables del fenómeno.

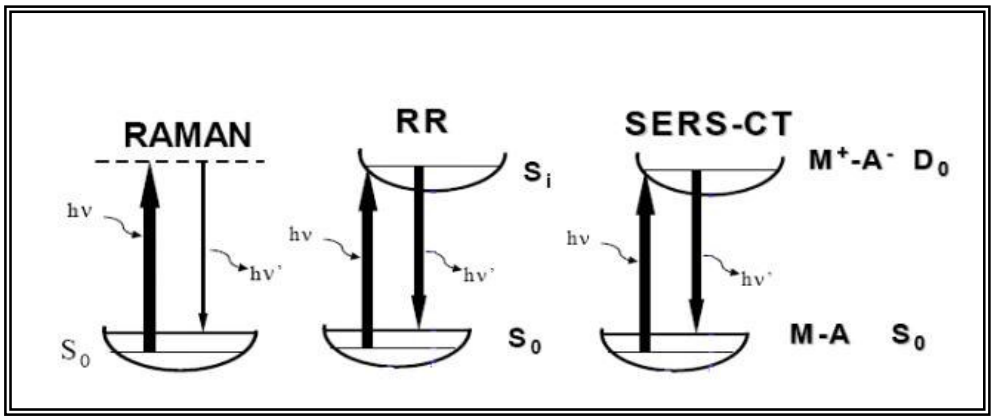
El modelo electromagnético predice un factor de intensificación de la señal Raman del orden de 10^6, que coincide bastante bien con los valores de **G** obtenidos experimentalmente. Este modelo también predice la dependencia del fenómeno de la naturaleza del metal, de manera que sólo los metales de acuñación Ag, Au y Cu dan lugar a una intensa dispersión SERS; la dependencia del efecto respecto de la forma y el tamaño de las partículas y la influencia en coloides de agregación de los mismos. Otra importante propiedad del efecto SERS predicha por este modelo es la depolarización de la dispersión elástica e inelástica que se genera en el sistema.

En el caso de ciertas moléculas es posible una segunda contribución, que se estima alrededor de 10^2–10^3 veces la señal Raman, explicada por el mecanismo de transferencia de carga, CT. De hecho, los cálculos realizados sobre modelos basados en el mecanismo EM predicen que la intensificación puede llegar a actuar incluso en moléculas situadas a distancias significativas de la superficie, mientras que en mecanismo CT se limita a aquellas que se encuentran adsorbidas directamente sobre el metal. Así, este es un fenómeno limitado a especies situadas en la primera capa de adsorción, con formación de un enlace químico con el metal.

Mientras que el mecanismo EM está presente en toda experiencia SERS, el mecanismo CT puede o no actuar dependiendo de las propiedades del complejo

superficial. Este mecanismo supone que el aumento en la señal Raman es debido a un fenómeno parecido a Resonancia Raman (RR) pero determinado por la resonancia con estados electrónicos originados en el proceso de adsorción de la molécula, en este caso sobre irregularidades metálicas de escala atómica, del orden de Ångstroms. Este tipo de estados, que no existen en la molécula aislada, son originados por la transferencia de carga entre el metal y la molécula. Así, en este mecanismo la molécula sería excitada hasta el nuevo estado estacionario CT, y la intensidad del espectro registrado en estas condiciones se intensificaría enormemente tal y como ocurre en RR.[24]

Figura 12.*Estados implicados en los mecanismos a) Raman, b) resonancia Raman (RR) y c) SERS en resonancia con estados de transferencia de carga (SERS-CT) del complejo superficial M-A.*



Fuente: GARCIA-RAMOS, J.V. Mecanismo químico en SERS

Aunque se han obtenido progresos considerables en la comprensión de los aspectos del mecanismo de intensificación, aún no existe un modelo que explique en su totalidad todas las observaciones experimentales.

Aún así, en el campo de la ciencia aplicada, SERS se ha posicionado como una herramienta útil en diferentes áreas. El potencial de esta técnica es evidente, ya que se puede obtener información estructural de manera cualitativa, resuelve preguntas acerca de la isomerización, orientación o grado de agregación; además,

es de especial importancia para la química de superficies en la comprensión de las interacciones de moléculas adsorbidas en superficies metálicas; es de interés relevante, en procesos fotocatalíticos, se ha aplicado exitosamente en electrocatálisis y corrosión de diversos substratos basados en metales de transición. Por otro lado, esta técnica tiene grandes ventajas desde una perspectiva analítica: es no destructiva, altamente selectiva y muy sensible, lo que la convierte también en una herramienta muy potente para el análisis de compuestos en disoluciones a muy baja concentración, se ha destacado en el análisis de trazas en matrices complejas que son encontradas en el medio ambiente, aplicaciones biomédicas, sensores biológicos

La versatilidad de esta técnica es acentuada por la variedad de métodos, usando diferentes tipos de substratos (electrodos, películas depositadas al vacío, películas "isla", coloides, etc) los cuales satisfacen los requerimientos de aplicaciones particulares.

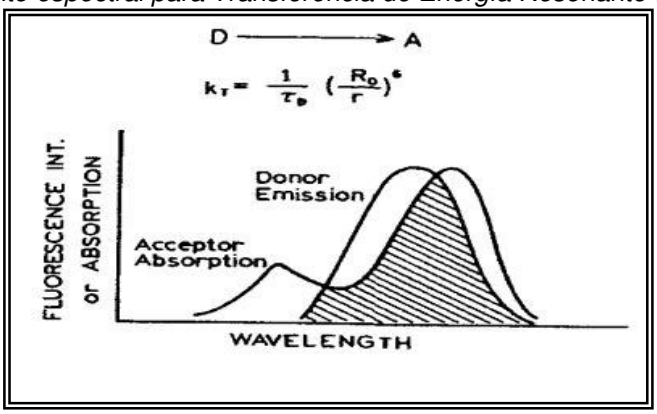
1.4.4. Transferencia de energía resonante

En el estado excitado ocurre otro proceso importante; transferencia de energía resonante, RET (Resonance Energy Transfer) o FRET (Förster Energy Transfer). Esta sucede, siempre que el espectro de emisión de un fluoróforo, llamada donor, se solape con el espectro de absorción de otra molécula, llamada aceptor (figura 13).

FRET implica la transferencia de la energía desde el donor (D) inicialmente excitado a un aceptor (A). Las moléculas donoras generalmente emiten a longitudes de onda más cortas que se solapan con el espectro de absorción del aceptor. En este proceso no se involucra emisión de luz por parte del donor, es decir, no es el resultado de la emisión del donor. En FRET no hay fotones

intermediarios; el donor y el aceptor se acoplan mediante una interacción dipolo-dipolo.[2]

Figura 13. *Solapamiento espectral para Transferencia de Energía Resonante (RET).*



Fuente: LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy

La velocidad de transferencia de energía depende del grado de solapamiento del espectro de emisión del donor y el espectro de absorción de el aceptor, del rendimiento cuántico del donor, de la orientación relativa de los dipolos de transición del donor y el aceptor y de la distancia entre las moléculas. La dependencia del efecto respecto a la distancia donor-aceptor, ha sido usada ampliamente para medir la interacción y la distancia entre donores y aceptores.

Por conveniencia, el solapamiento espectral es descrito en término de la distancia a la cual RET es eficiente en un 50%, denominada distancia Forster, (R_o). La velocidad de transferencia de energía $k_T(r)$ esta dada por:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_o}{r}\right)^6 \qquad \textit{(Ecuación 8)}$$

donde *r* es la distancia entre el donor (D) y el aceptor (A) y τ_D es el tiempo de vida del donor en ausencia de la transferencia de energía. De esta ecuación se observa que la velocidad de transferencia es igual a la velocidad de decaimiento del donor en ausencia del aceptor ($1/\tau_D$) cuando la distancia D-A (r) es igual a la

distancia Forster (R_o); en este caso ($r=R_o$) la eficiencia de la transferencia es del 50%; es decir, que a esta distancia la emisión del donor disminuiría a la mitad de su intensidad en ausencia de el aceptor.

Se puede asumir que la transferencia de energía seguramente ocurrirá siempre que entre los donores y aceptores exista una distancia Förster apropiada y que exista superposición espectral. Los valores de R_o se pueden predecir a partir de las propiedades espectrales de los donores y aceptores.

Cuando la transferencia de energía ocurre entre donores y aceptores distintos químicamente se denomina heterotransferencia y cuando ocurre entre moléculas idénticas se denomina homotransferencia (homoRET); esta última ocurre generalmente cuando los fluoróforos exhiben pequeños desplazamientos Stokes, debido a esto la distancia Forster para homotransferencia es cercana a 57Å.

La teoría de transferencia de energía se basa en el concepto de un fluoróforo como un dipolo oscilante, el cual intercambia energía con otro dipolo con una frecuencia de resonancia similar; este campo es amplio y complejo, la teoría es diferente para donores y aceptores que están enlazados covalentemente, libres en solución o en geometrías restringidas (membranas o ADN). Adicionalmente dependiendo del tiempo de vida del donor, puede incrementarse el alcance de la transferencia de energía predicha en la ecuación 8.

1.4.5. Transferencias de Cargas

Además de interacciones especificas entre la muestra y el solvente, muchos fluoróforos pueden formar estados de transferencia de cargas con moléculas a su alrededor, que son particularmente interesantes en el caso de nanopartículas o nanoestructuras metálicas. Estos estados de transferencia de carga dependen en

gran parte de la polaridad del solvente. En algunos casos la formación de estos estados requieren la rotación de grupos sustituyentes en el fluoróforo.

Actualmente, no hay una teoría simple que pueda ser usada para cuantificar e interpretar la dependencia del espectro de emisión con respecto a este efecto. La formación de estados de transferencia de carga ocurre en muchos fluoróforos y este efecto no esta contenido dentro de la teoría general de los efectos del solvente. La tendencia observada con la polaridad del solvente sigue la teoría general para efectos del solvente, pero a menudo se presentan desplazamientos adicionales debidos a interacciones específicas y a la formación de estados de transferencia de carga.

2. PARTE EXPERIMENTAL

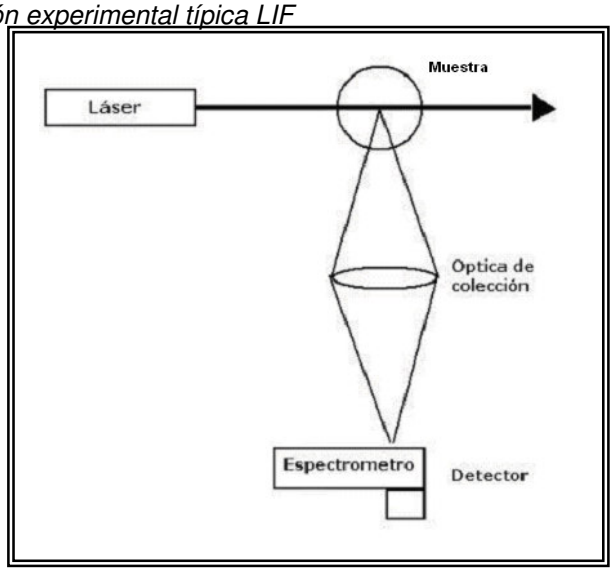
El grupo de Espectroscopia Atómica-Molecular de la Universidad Industrial de Santander, LEAM, ha venido desarrollando en las últimas décadas actividades en algunos aspectos modernos de la Espectroscopía Atómica-Molecular, generando aportes científicos y tecnológicos en diferentes áreas y soporte para la actividad de investigación en Ciencia y Tecnología de punta en el país.

Actualmente, el laboratorio cuenta con instrumentación base para la implementación de procedimientos LIF, Raman, SEF y SERS. Láser pulsado de Nitrógeno (PL 2300 PTILáser Inc), longitud de onda de 337.1 nm, 1.4 mJ por pulso, potencia 2.3 MW, ancho temporal de 600ps, ancho de banda 0.1 nm y frecuencia de 20 Hz. Láser de Nd-YAG pulsado (Quanta Ray, Spectra Physics) con frecuencia de 10 Hz, duración de pulso de 10 ns, 120 mJ por pulso, longitud de onda 1064nm y sistemas de multiplicación de frecuencia para 532, 355 y 266 nm. Espectrómetro tipo Czerny-Turner de 0,5 m de distancia focal, (Digikröm 740, Spectral Products) equipado con rejillas de difracción de 1200 surcos por mm con blaze en 600 y en 300 y rejillas de 150 surcos por mm con blaze en 600. Detector tipo CCD (128H, Princeton Instruments). Espectrógrafo Jarrel-Ash, tipo Ebert, de 3.4 m de distancia focal; con hendija de entrada variable, de 1-999 μm de ancho y 0-20 mm de altura; el sistema óptico interno está compuesto básicamente de un espejo de 16 cm de diámetro, que actúa simultáneamente como colimador, redireccionando paralelamente los haces de radiación incidentes y como espejo de cámara, que enfoca la radiación dispersada hacia el detector ubicado en el plano focal; con rejilla de dispersión (590 surcos/mm). Espectrómetro Ocean Optics HR4000 CG-UV-NIR, equipado con un detector CCD Toshiba TCD1304AP, que cubre un rango espectral de 200 a 1100nm. Elementos ópticos: lentes cilíndricos y esféricos de diversa distancia focal, diafragmas, filtros neutros y prismas.

2.1 MONTAJE DEL SISTEMA ESPECTROSCOPICO

El primer paso en el desarrollo de este proyecto, consistió en el diseño y montaje de un sistema para observar la fluorescencia inducida por láser. La figura 14 ilustra una configuración experimental básica para LIF; en este caso, el haz láser es enfocado sobre la muestra y la fluorescencia se recolecta a 90° por medio de la óptica apropiada. La radiación colectada pasa a través de un dispositivo dispersor (monocromador, filtro, etc) y es convertida en una señal eléctrica por el detector.

Figura 14. Configuración experimental típica LIF



En este trabajo se partió de esta configuración básica, proponiendo y explorando diferentes disposiciones con el fin de escoger el montaje experimental con las condiciones de trabajo óptimas para el mejoramiento de la señal y la obtención de los espectros. Se probaron diferentes diseños en cada uno de los elementos básicos: portamuestras, espejos, diafragmas, filtros, lentes de enfoque, óptica de colección, dispositivos dispersores, entre otros.

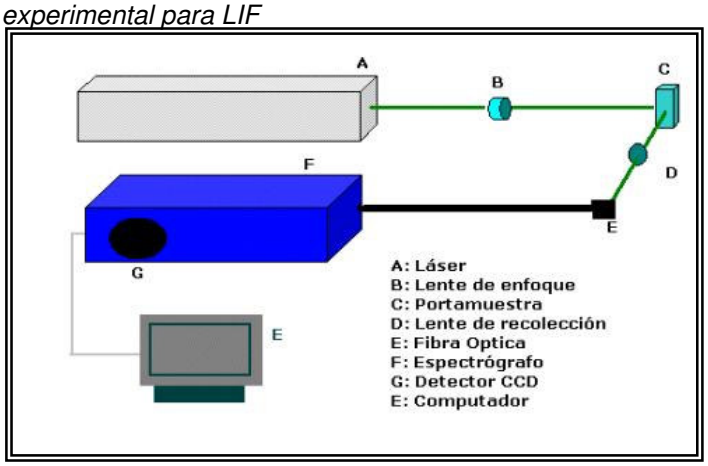
Para colocar la muestra se evaluaron dos recipientes: una celda de cuarzo de 1 cm^2 de paso y un capilar de vidrio de 1 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de longitud; de estos portamuestras, se escogió el

segundo para realizar los ensayos SEF Y SERS, ya que permite la reducción considerable del volumen de muestra y facilita la recolección directa de la radiación sobre la fibra óptica.

Se utilizaron como fuentes de excitación, el láser pulsado de nitrógeno y el de Nd-YAG en el modo long pulse. El haz láser se enfocó sobre la muestra inicialmente con un lente esférico de 20 cm de distancia focal y posteriormente se reemplazó, por un lente cilíndrico de 20 cm de distancia focal, para iluminar un mayor volumen de muestra, excitando mayor número de moléculas en la solución.

La radiación se recolectó inicialmente a 90° como se indica en la figura 15 utilizando un lente esférico de 5 cm de distancia focal enfocada sobre una fibra óptica Oriel, con la que se lleva al espectrómetro tipo Czerny-Turner y su detector tipo CCD.

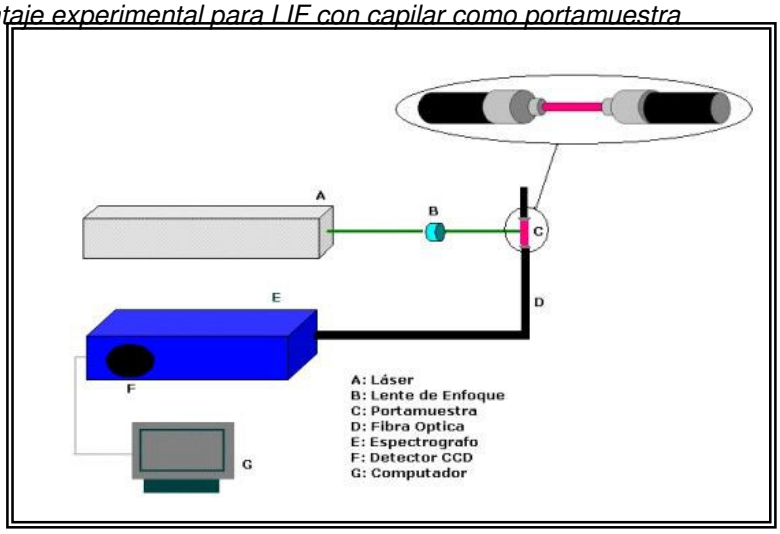
Figura 15. Montaje experimental para LIF



Este montaje funcionó bien para la recolección de la fluorescencia al usar cubetas como portamuestra; sin embargo, al utilizar el tubo capilar con el volumen iluminado considerablemente menor, el lente de recolección no ofrece mayores ventajas, así que se diseñó un aditamento que permite el acoplamiento directo de los extremos del capilar con la fibra óptica; de este modo, además de alinear el tubo con la entrada de la fibra óptica y disminuir la cantidad de elementos ópticos

en el montaje, el capilar actúa como guía de la radiación disminuyendo las pérdidas de la misma (figura 16).

Figura 16. Montaje experimental para LIF con capilar como portamuestra



Este último sistema espectroscópico fue utilizado también para dispersión Raman; esencialmente se empleó la misma configuración, solo que en este caso el láser de Nd-YAG se usó con una mayor energía (modo Q-switch).

El detector CCD limita la región espectral observada a un rango 300 nm para la rejilla de 150 surcos/mm y 30 nm para la rejilla de 1200s surcos/mm del espectrómetro Digikröm 740, Spectral Products; a estos intervalos, se les denomina Ventanas Espectrales. El espectrógrafo se usó con la rejilla de 150 surcos/mm para la observación de la fluorescencia y la rejilla de 1200 surcos/mm para Raman.

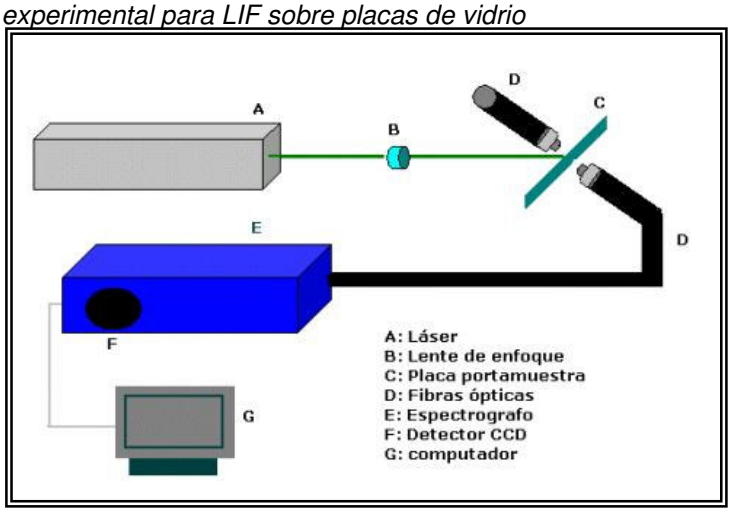
Para cada toma espectral se selecciona un centro de cámara apropiado. Para el caso de los experimentos Raman, el centro de cámara se escoge de tal forma que en la ventana no aparezca la línea Rayleigh ya que esta impide la observación clara de las líneas y su elevada intensidad puede dañar el detector.

Para la adquisición de los espectros se hacen dos tomas sucesivas irradiando la muestra durante dos segundos (20 pulsos); tiempo limitado por la elevada señal de fondo del detector sin refrigeración. Los espectros obtenidos se almacenan en un computador, se les resta el ruido de fondo con una segunda toma bajo las mismas condiciones experimentales en ausencia de la excitación del láser y posteriormente se analizan utilizando para ello el software comercial, WinSpec.

En las pruebas preliminares para LIF, en las cuales se evaluó el desempeño del montaje experimental, se utilizó como muestra Sulforodamina B. Con este sistema también evaluamos los espectros de fluorescencia de Antraceno y Raman de Tetracloruro de carbono, Benceno, Piridina y Tolueno.

Se diseñó y probó un sistema alternativo (Figura 17) para el estudio de la fluorescencia sobre placas de vidrio. Para este se utiliza el láser de Nd-YAG como fuente de excitación y se enfoca su radiación sobre la placa de vidrio utilizando un lente esférico de 20 cm de distancia focal.

Figura 17. Montaje experimental para LIF sobre placas de vidrio



En un principio, se utilizó como portamuestra una placa delgada de vidrio en la cual se ponía una gota de la solución a estudiar. Se probaron diversas configuraciones para el posicionamiento de la muestra sobre ella; sin embargo,

debido a la imposibilidad de controlar el volumen, la altura y la adherencia de la gota a la placa, se hizo necesario el diseño de una placa portamuestra con una microcavidad para colocar dentro de ella una placa delgada de vidrio recubierta o no y una gota de la muestra. Se utilizó una placa de vidrio portamuestra de microscopio de 22x22mm y 1mm de espesor; sobre esta se talló una cavidad de 11x11mm con espesor de 6mm; espacio suficiente para la lámina y la solución a estudiar. Finalmente, esta cavidad se cubre con una laminilla cubreobjetos de microscopio para sellar y retener la muestra; así como, proteger la fibra óptica del contacto con el líquido.

Para sostener la placa, se diseñó una bandeja especial que permite poner la lámina en una posición en la que las fibras ópticas queden justo por encima y por debajo de la muestra y en ángulo apropiado con respecto al haz láser. La radiación colectada se lleva al espectrógrafo equipado con una CCD.

En este trabajo se analizaron muestras de Sulforodamina B en ausencia y en presencia de películas islas de plata.

2.2 PREPARACION DE SUPERFICIES ADECUADAS PARA SEF Y SERS

Para SEF y SERS, se usan diferentes tipos de superficies metálicas: eléctrodos rugosos con nanoestructuras periódicas, suspensiones coloidales, películas islas, películas autoensambladas y predominantemente de plata y oro.

En este trabajo se prepararon coloides de plata y oro por reducción química y ablación láser, y se fabricaron películas islas y películas autoensambladas de plata sobre láminas delgadas de vidrio.

2.2.1 Preparación de coloides

2.2.1.1 Reducción química. Consiste en la reducción de una sal del metal mediante un reductor químico. Los coloides mas frecuentemente usados como substratos SERS y SEF, son producidos por reducción de nitrato de plata con citrato de sodio, en el llamado método de Lee-Meisel[24] o por reducción de nitrato de plata con borohidruro de sodio siguiendo el procedimiento de Creighton[25]. En este trabajo se prepararon coloides de plata utilizando ambos métodos.

Método de Lee-Meisel: se calienta una solución de nitrato de plata $1x10^{-3}$M hasta que la temperatura alcance 70°C; en este momento se agregan 0,5mL de solución de citrato de sodio al 1%, y seguidamente se aumenta la temperatura hasta 90°C, temperatura a la cual debe permanecer hasta que la solución cambie de incolora a amarillo. Durante todo el procedimiento se agita fuertemente la mezcla y al terminar el calentamiento, se permite que el coloide tome la temperatura ambiente; por último se coloca en un baño de agua y hielo por 15 minutos.

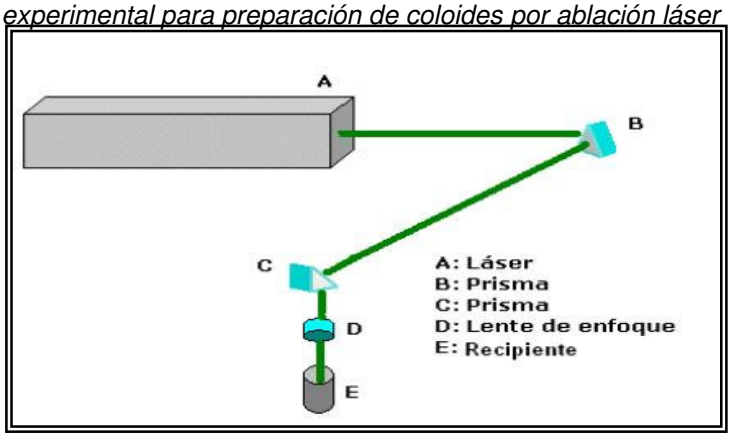
Método de Creighton; se mezcla gota a gota una solución de agente reductor, borohidruro de sodio $2x10^{-3}$M con una de nitrato de plata $1x10^{-3}$M que previamente se ha puesto en un baño de hielo; durante todo el procedimiento se agita fuertemente la mezcla hasta que tome una coloración amarilla, que posteriormente oscurece.

Se tomaron espectros de absorción de los coloides una vez preparados y después se les hace seguimiento durante varios días, con el fin de caracterizarlos. Estos coloides son muy sensibles a las condiciones experimentales y eventualmente se puede precipitar el metal; esto conduce a cambios en las propiedades del coloide de plata y a modificaciones en los factores de intensificación.

2.2.1.2 Ablación láser. Se trata de la dispersión de un metal mediante la irradiación del mismo con un haz láser pulsado. Mediante este método, el tamaño de las partículas puede controlarse modificando los parámetros experimentales de la ablación, tales como: energía del pulso, frecuencia de la radiación incidente, frecuencia de los pulsos, tiempo de irradiación, etc.

En esta investigación, se prepararon coloides de plata y oro por ablación láser; para esto se construyó un sistema experimental (Figura 18) utilizando para ello el láser pulsado de Nd-YAG (línea de excitación 532 nm) con duración de pulso de 10 ns. Para desviar el haz láser 90° en B y C, se usan prismas. Se enfoca la radiación con un lente esférico de 5 cm de distancia focal sobre la lámina de metal colocada en el fondo de un vaso de precipitado y sumergida en el solvente en el cual se prepara el coloide.

Figura 18. Montaje experimental para preparación de coloides por ablación láser



Para la preparación de los coloides por este método, se evaluaron diferentes parámetros: volumen de solvente (5 y 10 mL), tiempo de irradiación (10, 20 y 30 minutos), tamaño del vaso de precipitados (5, 10 y 100 mL), dilución del coloide obtenido (50 y 25%), reducción y uniformización del tamaño de partícula. También se prepararon coloides con diferentes solventes: agua, etanol y solución de sulfato de dodecilsodio (SDS) 0.01M.

Al igual que con los coloides obtenidos por reducción química, a estos coloides se les hace un seguimiento por absorción UV-Vis con el objeto de caracterizarlos. Debido a que el Microscopio de Fuerza Atómica, aún se encuentra en proceso de montaje, no ha sido posible dentro del trabajo, realizar la medida del tamaño de las nanopartículas.

2.2.2. Películas Islas (SIF'S)

En las preparación típicas de SIF's, las películas islas son depositadas sobre un substrato de vidrio de forma aleatoria, mediante la reducción de una sal de plata con la posterior adición de soluciones de hidróxido de sodio, hidróxido de amonio y glucosa, mientras el substrato esta sumergido en ellas. En el laboratorio se prepararon películas islas depositadas sobre placas de vidrio delgadas de 22x22 mm.

Antes de la deposición las láminas de vidrio se sumergen en una mezcla 10:1 de H_2SO_4 concentrado y H_2O_2 del 30% (también llamada solución piraña), durante la noche previa a la deposición; después, se lavan con agua destilada y se dejan secar al aire antes de usarse. Para la deposición de plata se utiliza un vaso de precipitados y una barra magnética recubierta de teflón como barra agitadora. Allí, se agrega a una solución de nitrato de plata (0.22gr de $AgNO_3$ en 26 mL de agua destilada) con agitación, 8 gotas de solución de NaOH al 5%, con lo que inmediatamente se forma un precipitado marrón oscuro. Se adiciona entonces, un poco menos de 1 mL de hidróxido de amonio para redisolver el precipitado. La solución clara, se enfría en un baño de hielo, hasta que tome una temperatura de aproximadamente 5℃, temperatura a la cual se añade una solución de D-glucosa (0.35 g en 4 mL de agua destilada) y se sumergen las láminas de vidrio previamente lavadas. Esta mezcla se agita durante dos minutos más a esta misma temperatura. Seguidamente, el vaso de precipitados se saca del baño de hielo, y se deja al aire libre hasta que tome temperatura ambiente, la solución se torna de

amarillo verdoso a marrón oscuro, mientras que las placas quedan color amarillo crema; en nuestro caso, los recubrimientos no fueron muy uniformes, presentando pequeñas áreas grises en la superficie.

Las láminas recubiertas se sacan de la mezcla y se lavan en un baño de ultrasonido por un minuto a temperatura ambiente; hecho esto, se lavan varias veces y se almacenan en agua.

2.2.3. Películas autoensambladas

Se realizó un primer intento en la preparación de películas autoensambladas, utilizando para ello 3-aminopropiltrietoxisilano (APS) para recubrir la superficie con grupos aminos; se trata de mantener un espacio entre la superficie metálica y la muestra, y mejorar la adhesión de las partículas metálicas a la lámina de vidrio. El procedimiento experimental en este caso es muy similar al de las películas islas, solo que una vez las placas se lavan en la solución piraña, estas se sumergen en una solución 1% de APS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Hecho esto, las placas se lavan varias veces con agua destilada y se secan al aire antes de la deposición; deposición que se realiza de la forma descrita anteriormente. Los recubrimientos obtenidos por este procedimiento resultan más oscuros que los obtenidos al no usar APS.

2.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE INTENSIFICACIÓN SUPERFICIAL

Para el estudio de SEF y SERS se utilizó el montaje de la figura 16, utilizando para ello compuestos disponibles y de interés en el laboratorio en presencia de las superficies metálicas de plata y oro preparadas por los métodos descritos anteriormente; se usaron compuestos como Sulforodamina B, Metilnaranja y Rodamina 6G perclorato con el objetivo de comprobar el efecto de intensificación superficial de la fluorescencia y moléculas tales como Tetracloruro de Carbono,

Benceno, Piridina, Tolueno, Sulforodamina B, rodamina 110, rodamina 6G perclorato y Metilnaranja para la demostración el efecto de intensificación sobre la dispersión Raman.

La concentración de las muestras en las soluciones fueron ajustadas para que el detector CCD en las condiciones de trabajo, pudiera detectar la señal. Para SEF fueron del orden de 10^{-4} M para el caso de metilnaranja y 10^{-8} M para Sulforodamina B y Rodamina 6G perclorato. Para el caso de SERS las concentraciones necesarias fueron considerablemente altas (del orden de 2 M para Benceno y Piridina), comparadas con las reportadas en la literatura (del orden de 10^{-8}–10^{-12} M); esto debido a la limitación en la detección, CCD carente de refrigeración.

Las soluciones de concentración apropiada de los analitos se combinan con el coloide fresco (para evitar problemas de estabilidad del mismo con el tiempo) en proporción 1:1 de tal forma que la concentración de analito en la mezcla sea detectable en ausencia del coloide (muestra de control). La mezcla analito-coloide se agita durante 30 minutos para asegurar el contacto de las moléculas con la superficie metálica; pasado este tiempo, se detiene la agitación y 1 hora después se utilizan estas mezclas para la toma de espectros con el fin de comprobar los efectos de intensificación.

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1. EVALUACIÓN DEL SISTEMA ESPECTROSCÓPICO.

Como se mencionó en el capitulo anterior, se propusieron diferentes montajes ópticos para seleccionar el que genera los mejores valores de intensidad de la fluorescencia de soluciones de Sulforodamina B. Se usó este colorante para la evaluación de los montajes experimentales debido a su alto rendimiento cuántico (0.68) y a que tiene un máximo de absorción en 556 nm; por tanto, puede ser excitado tanto por el láser de nitrógeno como por el de Nd-YAG.

Se detectó señal de fluorescencia en soluciones con concentraciones desde $4x10^{-8}$M. Las figuras 19 y 20 muestran la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración para los láseres de Nd-YAG y de nitrógeno, respectivamente; el recuadro en la parte superior es una ampliación de la región de concentraciones bajas.

Figura 19. *Intensidad de fluorescencia vs. Concentración utilizando el láser de Nd-YAG (532nm)como fuente de excitación*

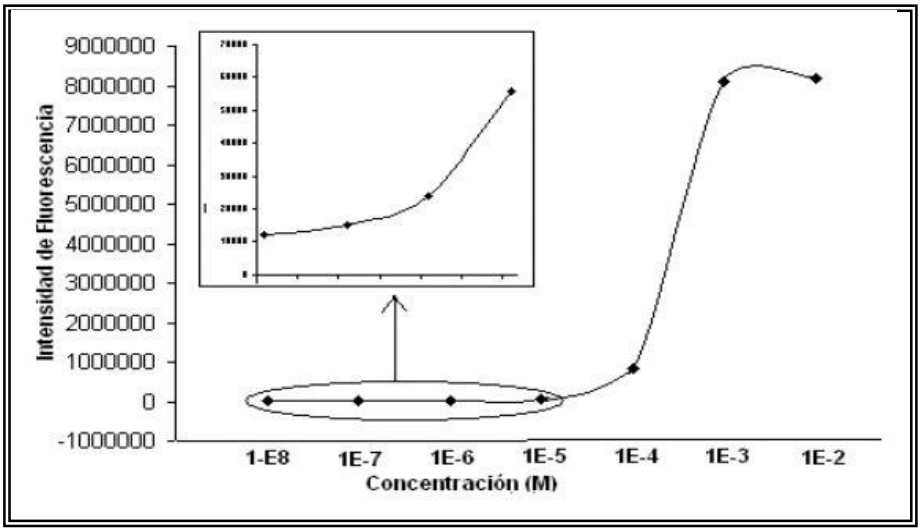
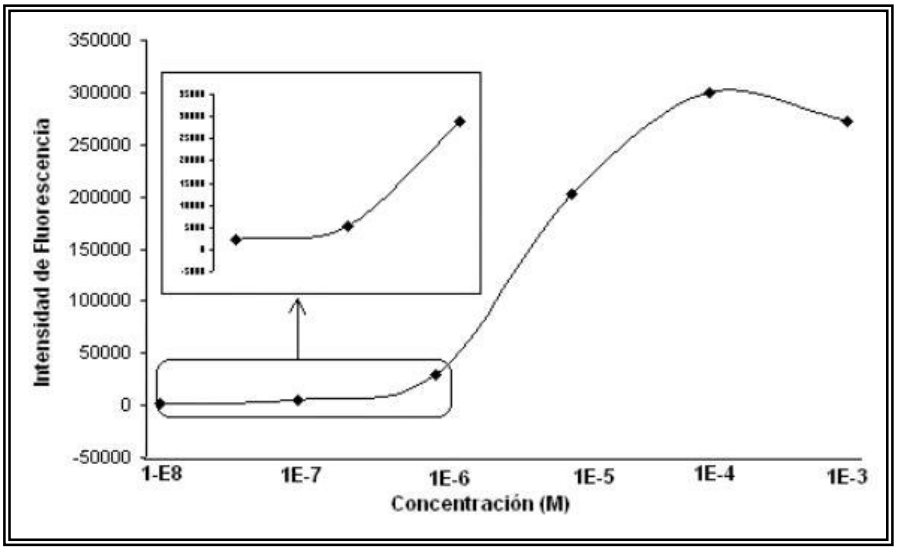


Figura 20. *Intensidad de fluorescencia vs. Concentración utilizando el láser de nitrógeno, como fuente de excitación*



En las dos gráficas se observa que la intensidad de la fluorescencia aumenta con la concentración de la muestra, hasta llegar a un máximo y despúes disminuye, debido al efecto de autoabsorción de la fluorescencia.

Debido a que la banda de absorción de la sulforodomina B tiene un máximo en 556 nm, en la excitación con el láser de Nd-YAG (532nm) como era de esperarse, las señales son de mayor intensidad que con el de nitrógeno (337.1nm); puede notarse en las figuras que la diferencia es bastante apreciable.

El examen de las gráficas 19 y 20 nos proporcionó un rango dinámico de trabajo. Se escogió como concentración para la evaluación del desempeño del montaje experimental, la solución de sulforodamina B en la región de 10^{-4}M, que exhibió la mayor intensidad de fluorescencia.

3.1.1. Portamuestra.

En el caso del portamuestras, los mejores resultados los obtuvimos utilizando el capilar de vidrio, esta disposición permite trabajar con pequeños volumenes de

muestra, en nuestro caso aproximadamente 10 microlitros, volumen considerablemente menor al que se utiliza en experimentos con cubetas de cuarzo (del orden de 3,5 mL). Además, el capilar simplifica la recolección de la radiación la cual entra en forma directa, desde el tubo hacia la fibra óptica.

3.1.2. Evaluación del sistema de enfoque.

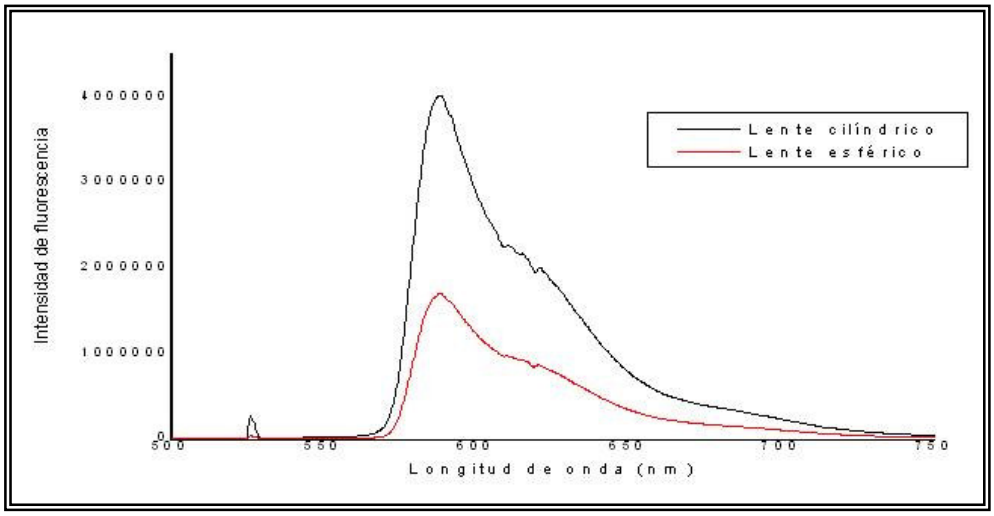
Se evaluó la intensidad de la fluorescencia de sulforodamina B al enfocar la radiación láser con un lente esférico y uno cilíndrico sobre el tubo capilar. Con el lente esférico el haz se concentra en un punto, mientras que con el cilíndrico el haz se concentra en una columna de aproximadamente 7mm a lo largo del capilar, excitando un volumen mayor de muestra y por tanto mayor cantidad de moléculas.

Se realizó un cálculo aproximado de la cantidad de moléculas excitadas al irradiar la muestra con los dos tipos de lentes teniendo en cuenta el volumen iluminado en cada uno de los casos.

Se encontró, que al enfocar con el lente esférico, en el caso de fluorescencia, se excitan aproximadamente 10^9 a 10^{14} moléculas de sulforodamina B con soluciones de concentración ~10^{-8}M a ~10^{-3} M; en Raman, donde se trabajó con molaridades de 1 y 2 M, se excitan aproximadamente 10^{17} moléculas de sulforodamina B; mientras que con el lente cilíndrico, se excitan en el caso de fluorescencia en los mismos rangos de concentración entre 10^{10} a 10^{15} moléculas de sulforodamina B y en Raman 10^{18} moléculas de sulforodamina B. Con el lente cilíndrico se excitan un mayor número de moléculas, aproximadamente un orden de magnitud por encima del número de moléculas excitadas con el lente esférico. Este incremento en número de moléculas, se ve reflejado en el espectro de fluorescencia (figura 21), que exhibe mayor intensidad.

Se decidió utilizar el lente cilíndrico con el objetivo de obtener la mayor excitación.

Figura 21. Espectro de fluorescencia de Sulforodamina B 4.69x10^{-4}M . Enfocando con los lentes esférico y cilíndrico.



3.1.3. Fuente de excitación.

Como fuente de excitación para fluorescencia, se utilizaron ambos láseres tanto el de nitrógeno como el de Nd-YAG en el modo long-pulse. Finalmente, se utilizó más que todo el de Nd-YAG, por conveniencia debido al intervalo de absorción de las muestras trabajadas. En el caso de Raman, se usó el láser de Nd-YAG con la línea 532 nm en el modo Q-switch y energía por pulso de aproximadamente 120 mJ, energía suficiente para detectar señales Raman de diferentes compuestos de interés.

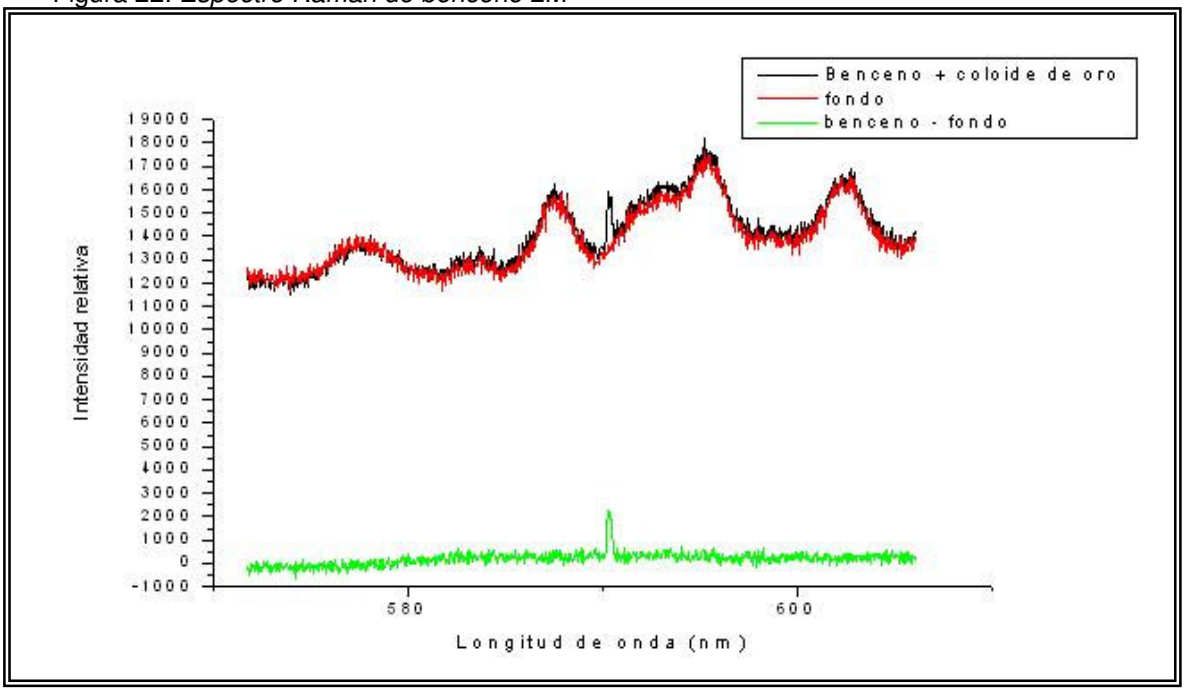
3.1.4 Detector

Como detector se uso el detector CCD. Durante el desarrollo de esta investigación la cámara CCD trabajó sin refrigeración debido a un daño en su funcionamiento.

La carencia de refrigeración constituye una limitación muy importante en la detección de señales débiles; por una parte, el ruido que se sobrepone a las señales prácticamente las hace desaparecer y además hace imposible detecciones en tiempos prolongados (varios segundos) que son un recurso normal en la detección de señales débiles, caso de la espectroscopia Raman. De hecho, para la obtención de espectros Raman de buena calidad se usan normalmente detectores Intensificados y tiempos largos de detección; en nuestro caso y bajo estas circunstancias desafortunadas, consideramos un logro haber obtenido espectros Raman de algunos compuestos con concentraciones no muy bajas.

Para poder observar los espectros de Fluorescencia y Raman con la cámara CCD no refrigerada; fue necesario restar los espectros del fondo, ya que el alto ruido solapaba casi completamente las señales. En la figura 22 se puede observar claramente el efecto de la radiación de fondo sobre las señales Raman.

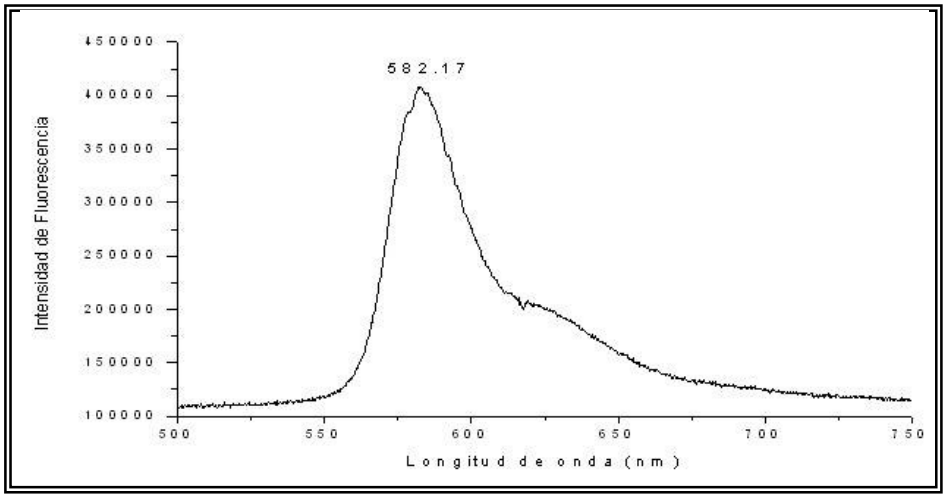
Figura 22. *Espectro Raman de benceno 2M*



3.2. PRUEBAS DE FLUORESCENCIA

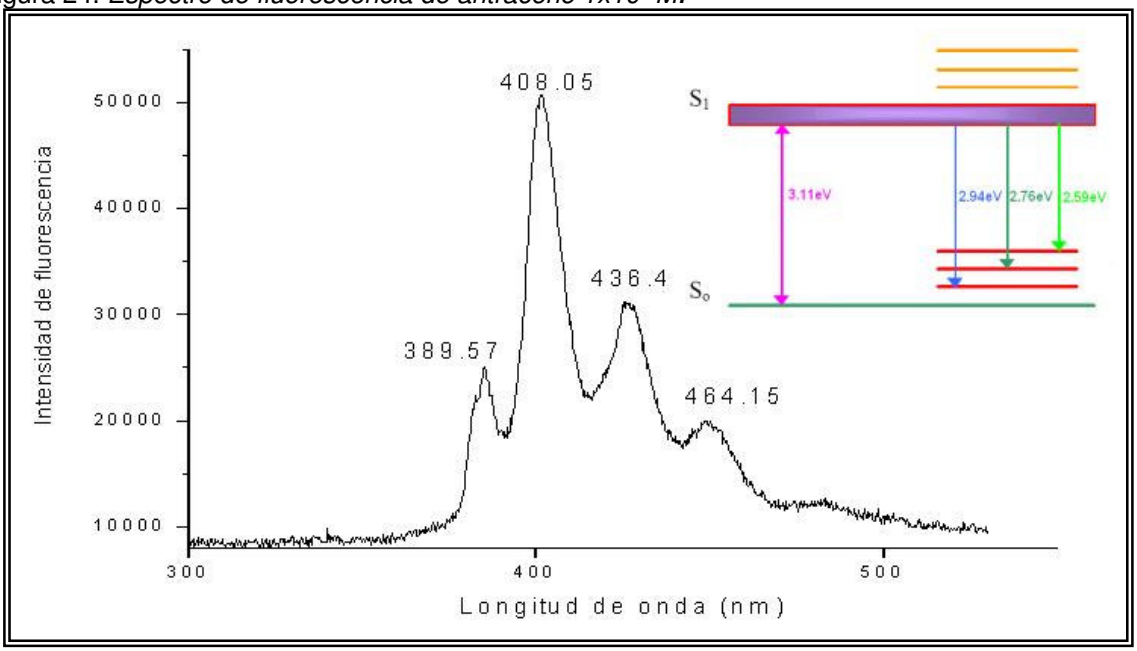
La figura 23 muestra el espectro de fluorescencia de una solución de sulforodamina B de concentración $1x10^{-4}$ M. Este espectro se tomó utilizando el montaje mostrado en la figura 16 con el láser de Nd-YAG en el modo long-pulse; la banda de fluorescencia se extiende desde 550 hasta 700 nm, presentado un máximo en 582.17 nm.

Figura 23. *Espectro de fluorescencia de sulforodamina B*



La figura 24 presenta el espectro de fluorescencia de una solución $1x10^{-3}$M de antraceno en etanol utilizando el montaje de la figura 16, con el láser de nitrógeno como fuente de excitación; se puede apreciar en la gráfica estructura vibracional, con 4 máximos relativos, localizados en 389.57, 408.05, 436.43 y 464.15 nm, estas bandas son el resultado de transiciones desde el el nivel mas bajo del primer estado excitado hacia los diferentes niveles vibracionales del estado fundamental.

Figura 24. *Espectro de fluorescencia de antraceno 1x10^{-3}M.*



Con el montaje de la figura 16 también se obtuvieron espectros de fluorescencia de Coumarina 307 y Rodamina 6G perclorato (Figuras 25 y 26), estos espectros exhiben una banda que se extiende desde 475 a 545nm, centrada en 508,18 y desde 550 a 700nm, centrada en 581.5 nm, respectivamente.

Figura 25. *Espectro de fluorescencia de Coumarina 307 5,5x10$^{-3.}$M excitado con el láser de nitrógeno*

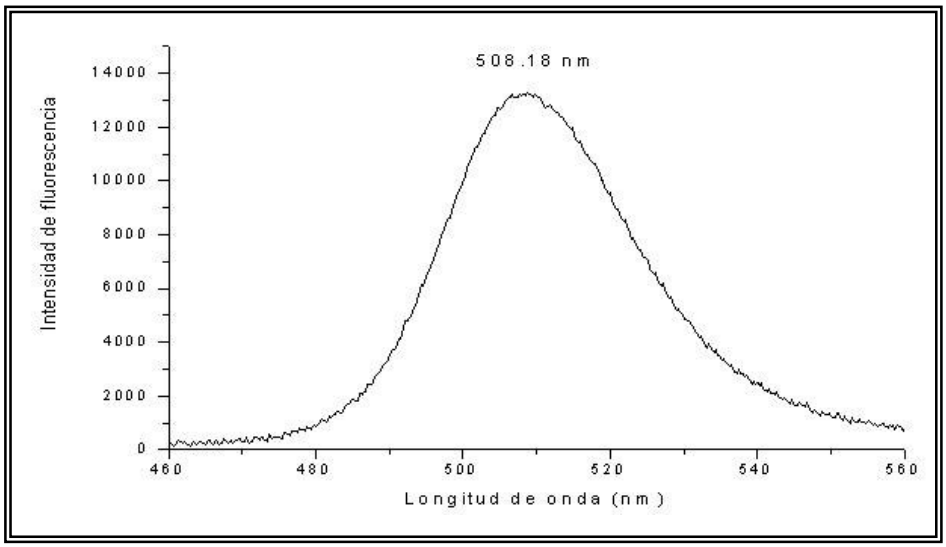
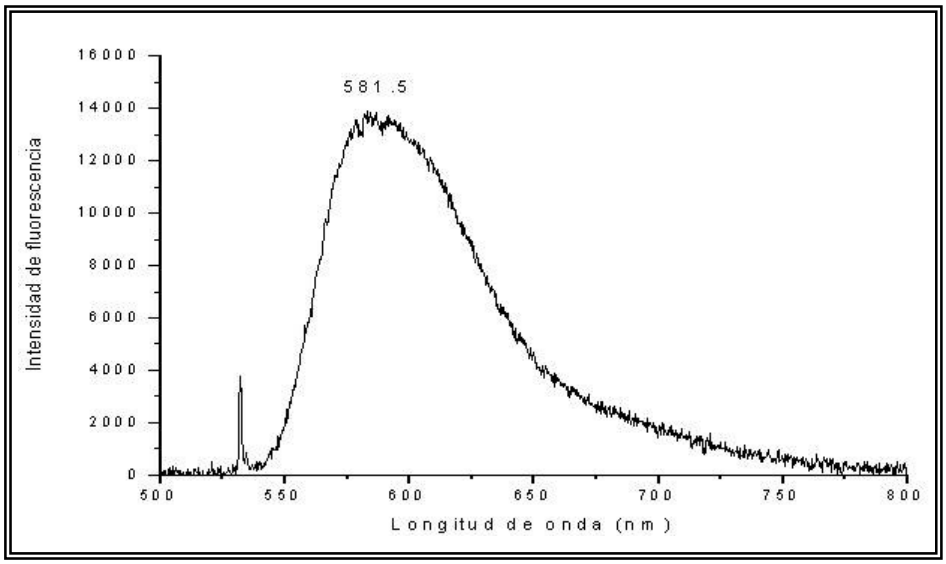


Figura 26. *Espectro de fluorescencia de Rodamina 6G perclorato 2x10^{-6} M excitado con el láser de Nd-YAG*



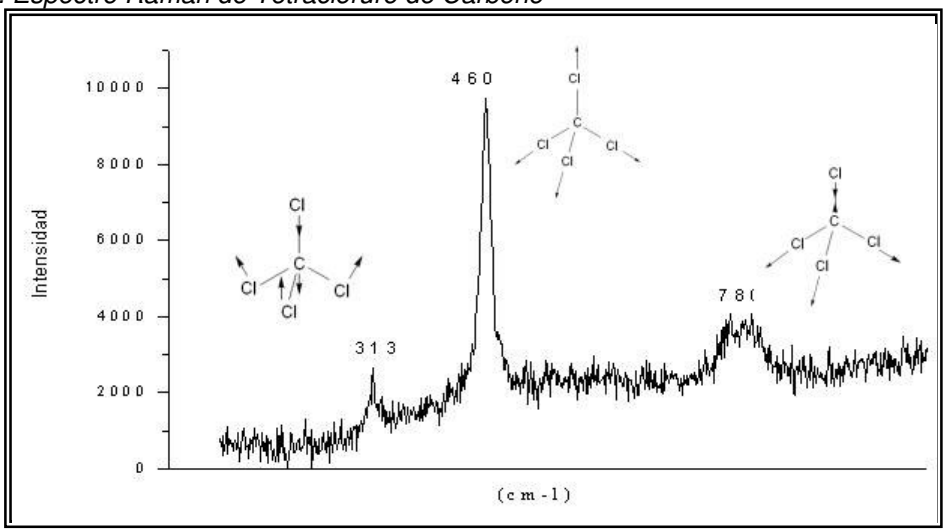
3.3. PRUEBAS DE DISPERSION RAMAN

Los estudios de dispersión Raman se hicieron utilizando también el montaje de la figura 16 con un capilar de vidrio como portamuestra; sólo que en este caso, el láser de Nd-YAG se usa en el modo Q-switch de mayor energía, aproximadamente 120 mJ, con duración de pulso 10 ns. Este montaje permitió la obtención de espectros Raman de Tetracloruro de Carbono, Benceno y Piridina con una señal Raman Stokes claramente visible que concuerdan bastante bien con las reportadas en la literatura.

La figura 27 muestra el espectro Raman de Tetracloruro de Carbono; esta molécula es tetraédrica, de grupo puntual T_d, tiene 9 modos normales de vibración, de los cuales 4 son Raman activos. Este espectro se caracteriza, principalmente, por tres bandas registradas en la región de 300-800 cm^{-1}: una banda intensa en 460 cm^{-1} asignada al modo de vibración de tensión simétrica, y dos bandas de menor intensidad en 313 y 780 cm^{-1}, que corresponden al modo de

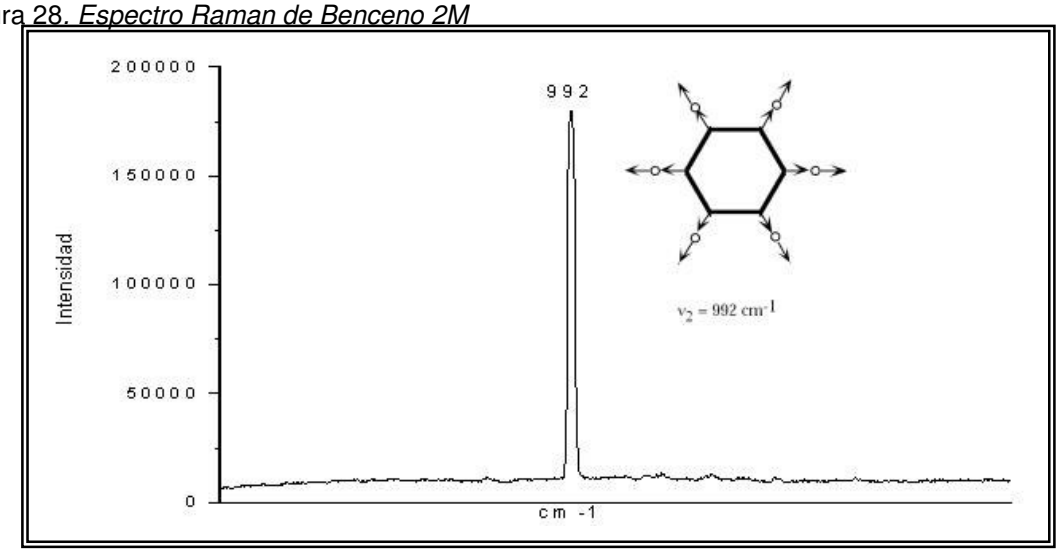
vibración de flexión y al modo de vibración de tensión asimétrica, respectivamente[26].

Figura 27. *Espectro Raman de Tetracloruro de Carbono*



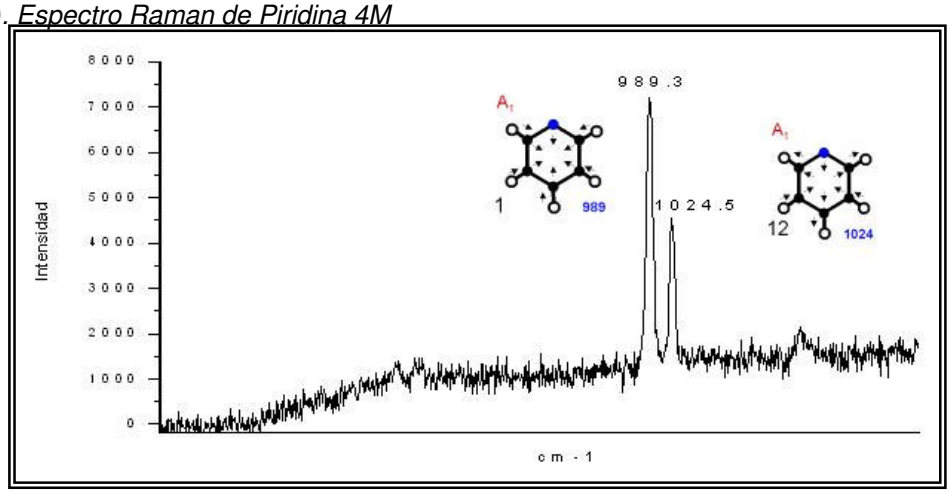
Con este sistema experimental se observó también el espectro Raman de Benceno; esta molécula es hexagonal, de grupo puntual D_{6h}; con un total de 20 modos vibracionales; de ellos, 6 activos Raman. La gráfica 28 muestra el espectro Raman; la señal en 992 cm^{-1} corresponde a la vibración de tensión del anillo[26].

Figura 28. *Espectro Raman de Benceno 2M*



Por último, se tomó el espectro Raman de piridina; esta molécula es plana y hexagonal; tiene 27 modos normales de vibración y pertenece al grupo puntual C_{2v}. La figura 29 muestra el espectro Raman de piridina; las señales en 989 y 1024 cm^{-1} corresponden a los modos vibracionales de respiración (breathing) u oscilación volumétrica del anillo total simétrica y antisimétrica, respectivamente[27].

Figura 29. *Espectro Raman de Piridina 4M*



3.4. SUPERFICIES PARA SEF Y SERS

En este trabajo se evaluaron algunos de los métodos de preparación de superficies apropiadas para SEF y SERS reportadas con frecuencia en la literatura, de acuerdo a la disponibilidad de reactivos e instrumentación del laboratorio. Preparamos coloides y películas islas y autoensambladas de plata y oro, por métodos químicos y por ablación láser.

La caracterización de nanopartículas metálicas puede hacerse mediante métodos espectroscópicos o microscópicos (microscopías electrónicas de transmisión, de barrido, de fuerza atómica, etc.). Las nanopartículas de plata, oro y cobre exhiben bandas de absorción muy intensas en el ultravioleta-visible. El modelo de Mie que explica este fenómeno se basa en la solución de las ecuaciones Maxwell para la

dispersión de la radiación electromagnética por nanoesferas metálicas. La teoría de Mie considera dos grandes aproximaciones:

1. El caso de nanopartículas de diámetro menor que el recorrido libre promedio de los electrones libres (MFP, Mean Free Path), que corresponde a partículas pequeñas comparadas con la longitud de onda de excitación (D < 20nm para oro y plata bajo excitación λ=532 nm). Esta primera aproximación se conoce como una aproximación dipolar o cuasiestática, ya que considera que la dispersión es dominada por interacciones dipolares; bajo estas condiciones, la constante dieléctrica resulta función del tamaño de las partículas; por esta razón, se le conoce como efecto intrínseco y en ese caso, se prevee que la anchura de la banda de resonancia plasmónica es proporcional a 1/R, donde R es el radio de la partícula.

2. El caso de nanopartículas de diámetro igual o superior al recorrido libre promedio (MFP), que corresponde a tamaños de partícula mayores a la longitud de onda de excitación (D>>30-40nm). Para este tipo de partículas, la dispersión es función de interacciones dipolares y multipolares; especialmente, cuadrupolares y octupolares. En esta aproximación, no se habla de constante dieléctrica dependiente del tamaño de partícula; por esta razón, se le conoce como efecto extrínseco. En este caso, se presenta un desplazamiento al rojo con el aumento en el tamaño, y a diferencia del caso intrínseco, el ancho de banda crece con R.

Los espectros de absorción permiten observar y evaluar los efectos de resonancia plasmónica de las nanopartículas metálicas, los cuales están relacionados con el tamaño y morfología de las mismas. La posición, forma e intensidad de la banda de resonancia de plasmones superficiales, depende fuertemente de varios factores: constante dieléctrica del medio, tamaño y forma de las nanopartículas y de las interacciones electrónicas con otras partículas en el medio.

Con base en esto, se hizo una primera aproximación a una caracterizaron de las nanopartículas por absorción UV-Vis, utilizando para ello el espectrofotómetro UV-2550 Shimadzu. La opción de caracterización con el microscopio de Fuerza Atómica (FA) no ha sido posible aún, por estar apenas en proceso el montaje del microscopio.

3.4.1. Coloides

Para la preparación de coloides preparados por reducción química, se usaron los métodos de Lee-Meisel[24] y Creighton[25]. En el primero, se usa como agente reductor borohidruro de sodio, que es un reductor muy poderoso; por esta razón, es necesario llevar a cabo la reacción en frío para evitar una agregación extensa de las partículas iniciales. En el segundo, se utiliza el citrato de sodio, que es un reductor más débil y necesita alta temperatura durante un tiempo prolongado para poder reducir el metal. La reacción de reducción sigue el siguiente esquema:

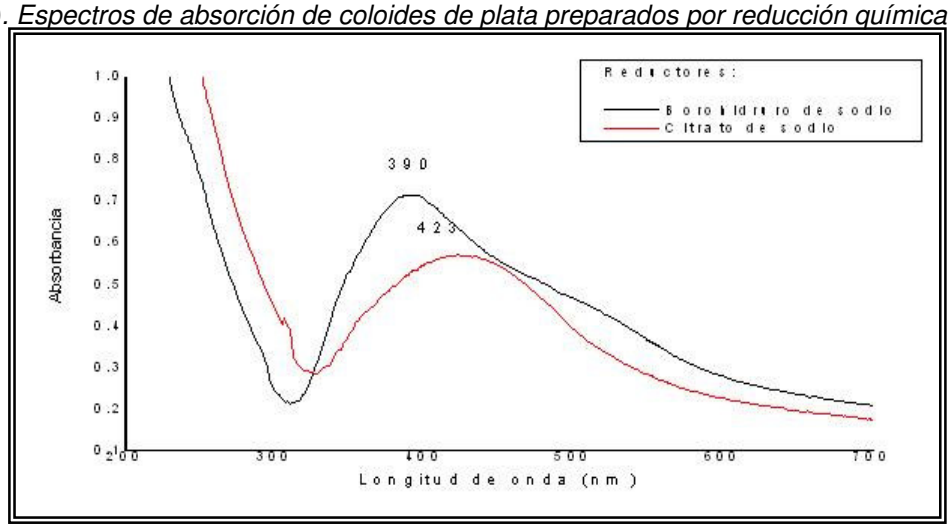
$$M^{+} + \text{Reductor} \rightarrow M^{0} + \text{Productos} \qquad \text{(Ecuación 9)}$$

A la formación de los átomos del metal, le sigue un proceso de crecimiento que todavía no se conoce en detalle. Por otro lado, diferentes reductores pueden dar lugar a diversas distribuciones de tamaño dependiendo de la naturaleza del metal; estas diferencias deben verse reflejadas en el espectro de absorción en la banda plasmónica.

La figura 30 muestra los espectros de absorción de coloides de plata preparados por métodos de reducción química, utilizando como reductores: borohidruro y citrato de sodio; los espectros exhiben bandas con máximos en 390 y 423nm, característicos de plasmones superficiales de plata. Se observa una banda

centrada a mayores longitudes de onda, en el caso de citrato; esto podría indicar la presencia de partículas de mayor tamaño que las obtenidas con borohidruro como reductor.

Figura 30. *Espectros de absorción de coloides de plata preparados por reducción química*



Los coloides de plata obtenidos por los métodos químicos son sensibles a muchos factores experimentales, incluyendo temperatura, velocidad de agitación de la mezcla y de adición de los reactivos, pureza de los reactivos, entre otras.

Un problema importante en la preparación química de coloides de plata es la presencia de iones residuales y productos no deseados, los cuales obstaculizan el control del proceso en aplicaciones en la espectroscopia SEF y SERS con diferentes adsorbatos. Se sabe por ejemplo, que en el caso de los coloides de plata producidos por reducción con borohidruro, se generan boratos cuyas bandas espectrales se observan en algunos casos en los espectros SEF y SERS de los adsorbatos.

Se han propuesto diversas técnicas para resolver el problema. Una manera de preparar coloides de metales químicamente más puros, es la ablación láser de

metales puros en medio acuoso y otros solventes. Las ventajas de este método son la simplicidad del procedimiento, la posibilidad de utilizar diferentes metales y solventes y la ausencia de reactivos químicos o iones en la preparación final. Además se obtienen coloides metálicos mas estables temporalmente que los preparados en ausencia de iones o moléculas extrañas.

Aquí, se prepararon coloides de oro y plata por ablación láser utilizando el montaje descrito en la figura 18. Cabe anotar que normalmente estos coloides se preparan utilizando láminas de oro y plata y solventes de muy alta pureza para garantizar que el coloide final este libre de otros productos. En nuestro caso se utilizaron láminas de oro y plata comerciales (plata ley 950 de 95% de pureza y oro con impurezas de 2 ppm cobre y 3 ppm de otras impurezas); por esta razón, no se puede garantizar elevada pureza de los coloides obtenidos. Se usaron las láminas comerciales, para tratar de desarrollar un procedimiento de obtención de coloides, aplicable en condiciones normales y con costos manejables.

Para la preparación de coloides por ablación, se evaluaron algunos parámetros, con el fin de obtener superficies activas SERS. Se hicieron pruebas del efecto del tiempo de irradiación sobre las láminas de plata y oro en la preparación de coloides. En los espectros de absorción (Figuras 31 y 32), tras 10, 20 y 30 minutos de ablación láser, se observa que la intensidad de la banda plasmónica en 520 en el caso de nanopartículas de oro y en 400 para nanopartículas de plata, crece hasta 20 minutos de irradiación; para tiempos mayores de 20 minutos no hay un cambio considerable en la intensidad de la banda, por esta razón se escogió como tiempo de ablación para la preparación de coloides, 20 minutos.

Figura 31. *Espectros de absorción UV-vis de nanopartículas de oro por ablación láser en función de tiempo de ablación*

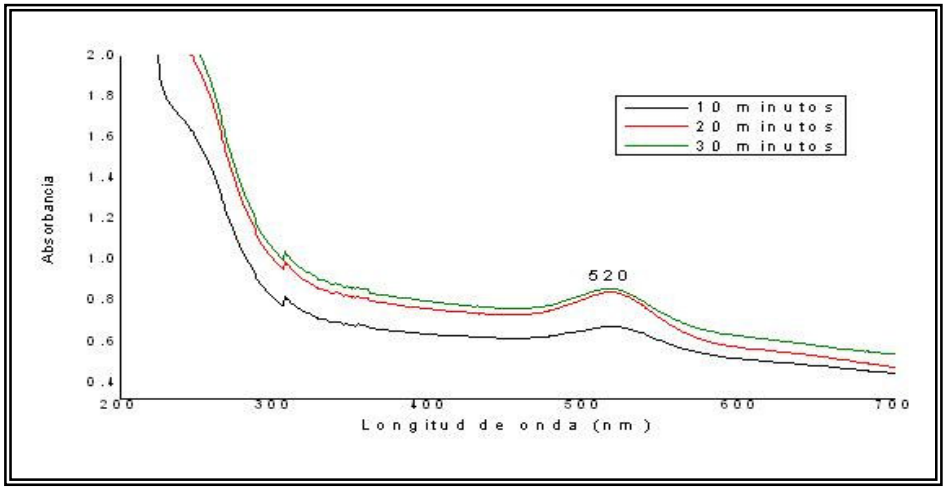
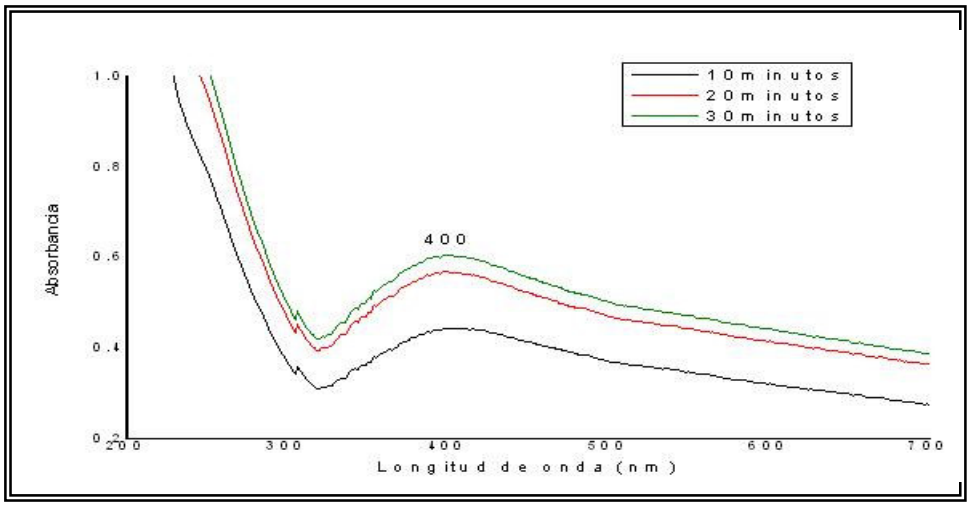


Figura 32. *Espectros de absorción UV-vis de nanopartículas de plata por ablación láser en función de tiempo de ablación*

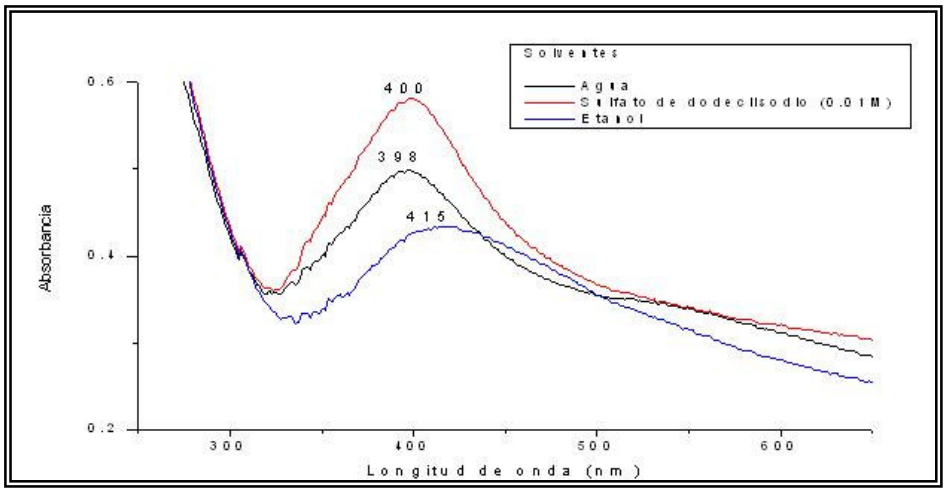


Se prepararon coloides en diferentes solventes, teniendo en cuenta la solubilidad de algunas de las muestras a evaluar y para estudiar simultáneamente el efecto del solvente sobre las características morfológicas del coloide. En el caso de la adición del Sulfato de Dodecilsodio, se quieren estudiar los efectos del surfactante en los procesos de agregación. La figura 33 muestra los espectros de absorción de coloides de plata dispersados en 3 solventes: agua, solución acuosa de sulfato

de dodecilsodio (SDS) y etanol, bajo las mismas condiciones experimentales. Las bandas de absorción de los coloides preparados con cada solvente exhiben máximos característicos de plasmones de plata con algunos desplazamientos (400, 398 y 315 nm respectivamente).

Se observan pequeñas diferencias: en cuanto a intensidad, siendo el coloide en sulfato de dodecilsodio el que mayor absorción presentó, diferencias en el ancho de banda y desplazamientos hacia el rojo que parecen indicar que los coloides en agua y en SDS son de menor tamaño que en etanol. Además, el mayor ancho de banda en SDS indica que las nanopartículas son de menor tamaño que en agua; así el SDS exhibió el efecto de protección contra la agregación esperado.

Figura 33. *Espectros de absorción UV-vis de nanopartículas de plata por ablación láser en diferentes solventes*

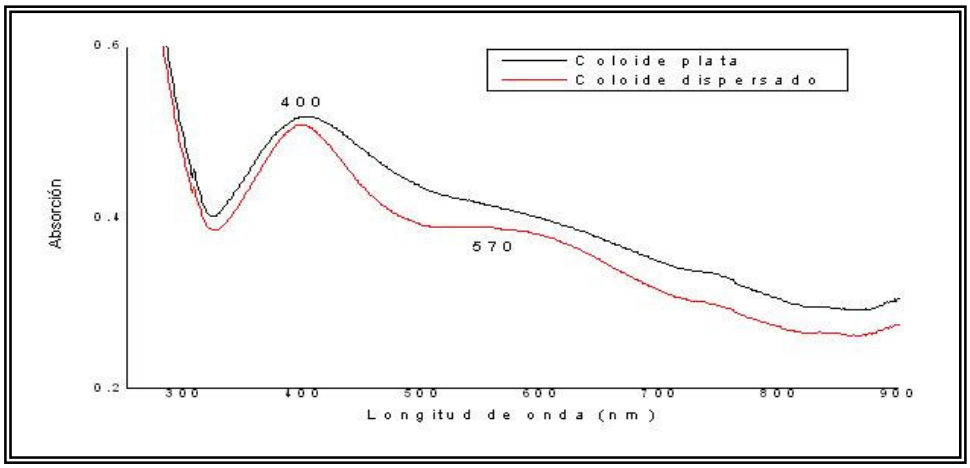


Los coloides de plata obtenidos inicialmente por ablación láser, se sometieron a irradiación posterior con el láser de Nd-YAG (532 nm), con el fin de dispersar y uniformizar las partículas; con la posibilidad de formación de redes. Los espectros de absorción (figura 34), muestran los cambios sufridos por los coloides después del tratamiento; los coloides preparados inicialmente (línea sólida) presentan una banda de absorción con un máximo en 400 nm, característica de plasmones

superficiales de plata. Después de 20 minutos de irradiación con el láser de Nd-YAG, el máximo de absorción se desplaza muy levemente al azul (398 nm); además, el ancho de banda se reduce y se aprecia la aparición de un hombro en 570 nm, que indica la aparición de redes de partículas.

La reducción del ancho de banda después de la irradiación, indicaría crecimiento de las nanopartículas si estuvieran en la región intrínseca; sin embargo, esto no tendría mucho sentido, si se toma en cuenta que la irradiación debe dispersar las nanopartículas. Podría ser que se esta partiendo de partículas grandes (región extrínseca) que al ser dispersadas disminuyen de tamaño, y en este caso, la disminución del ancho de banda indicaría también disminución del tamaño de partícula. También podría considerarse que en nuestro caso, no existe una distribución uniforme de tamaños en el coloide; y así, es difícil relacionar el efecto de la dispersión con una variación en la anchura.

Figura 34. *Espectros de absorción UV-vis de nanopartículas de plata por ablación láser y dispersado*



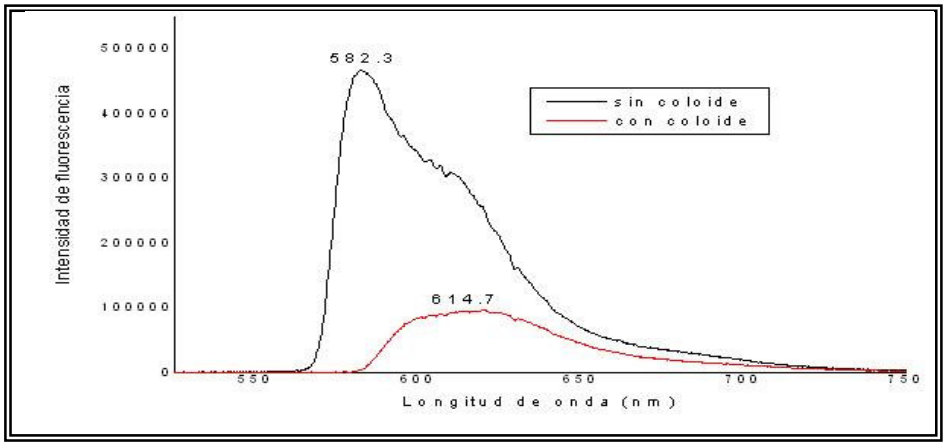
3.5 PRUEBAS SEF

Para determinar los efectos de las superficies metálicas sobre la fluorescencia se usaron soluciones de una concentración dada del analito adicionado con coloide

de plata en diferentes proporciones (1:10, 1:5. 1:3, 1:2, 1:1 analito-coloide) para obtener muestras de concentraciones especificas en la solución final. Las pruebas se realizaron utilizando el montaje de la figura 16, tanto con el láser de nitrógeno como el de Nd-YAG. Desde luego cada vez se toma un espectro del analito en ausencia del coloide en la misma concentración que la presente en la mezcla con coloide.

La figura 35, muestra los espectros de fluorescencia de Sulforodamina B (SB) en presencia y en ausencia de coloide de plata. Como puede verse, la solución de SB presenta una banda con estructura, el máximo esta centrado en 582 nm y tiene un hombro a mayores longitudes de onda. En presencia del coloide, la intensidad de la fluorescencia es considerablemente apagada; lo cual, corresponde a las predicciones para interacciones fluoróforo-nanopartícula metálica a cortas distancias (0-25nm); y se observa una banda de menor intensidad centrada prácticamente en la posición del hombro en la fluorescencia en ausencia de coloide.

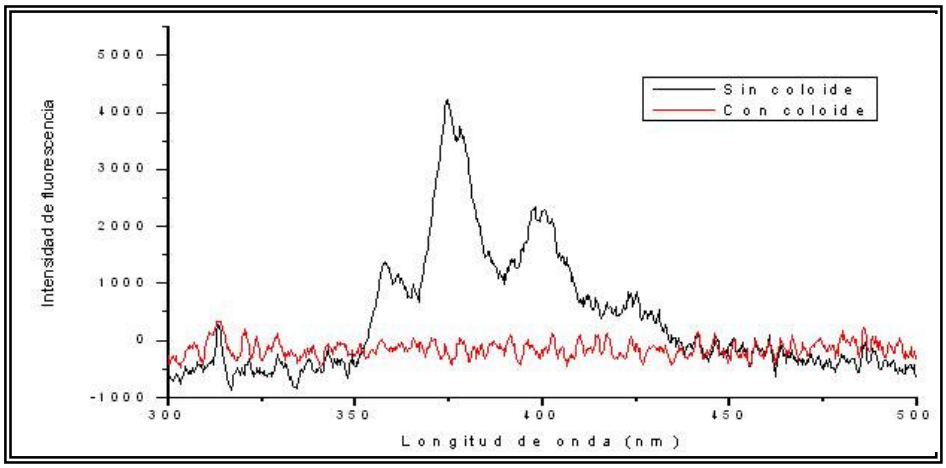
Figura 35. *Espectros de fluorescencia de Sulforodamina B en presencia de coloide de plata. Excitación láser de Nd-YAG*



En el caso de antraceno (figura 36) el efecto de apagamiento es aún más marcado. El espectro de fluorescencia exhibe las bandas típicas del antraceno en

solución; en presencia del coloide de plata no se observa fluorescencia, esta es completamente apagada por las nanopartículas metálicas.

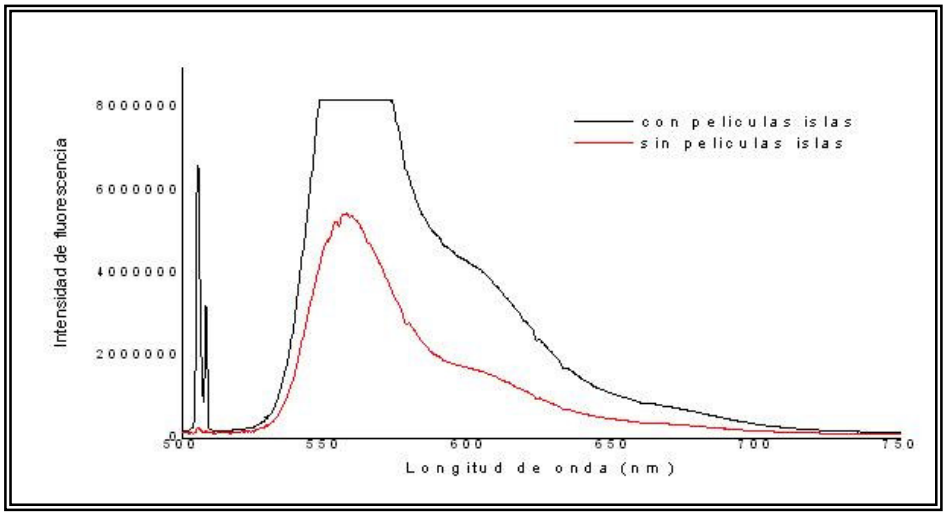
Figura 36. *Espectros de fluorescencia de Antraceno en presencia de coloide de plata. Excitación láser de Nitrógeno*



El apagamiento de la fluorescencia en ambos casos se atribuye a la proximidad de los fluoróforos a las superficies metálicas; en estas condiciones, se produce una transferencia de energía desde el nivel electrónico excitado del fluoróforo a la superficie metálica que conduce a la desaparición de los picos de fluorescencia.

En mezclas del analito con el coloide, no es posible controlar la distancia fluoróforo-metal; para hacerlo, tendrían que prepararse coloides con monocapas espaciadoras. Como una posibilidad de controlar la distancia fluoróforo-metal, se prepararon películas islas depositadas sobre láminas de vidrio y se hicieron unos primeros ensayos, en la fabricación de películas autoensambladas, que consisten en cubrir las superficies con grupos silanos que produzcan un espaciamiento entre la nanoestructura metálica y el fluoróforo que se quiere observar. La figura 37 muestra un único resultado en que aparentemente se observa intensificación.

Figura 37. *Espectros SEF de Sulforodamina B 4.69x10^{-9}M sobre películas islas de plata*

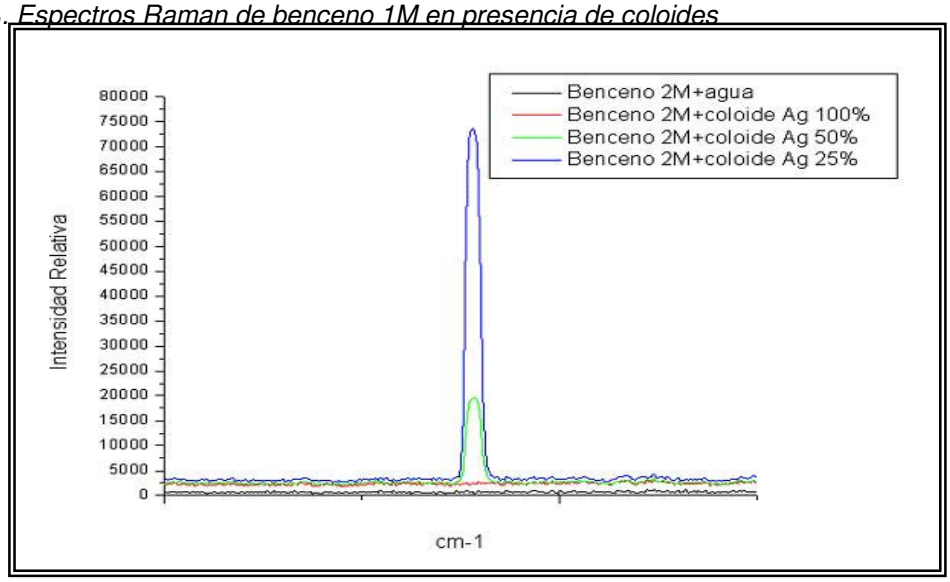


3.6 PRUEBAS SERS

Los estudios SERS se hicieron con el montaje esquematizado en la figura 16, utilizando el láser de Nd-YAG en el modo Q-switch. Para establecer los efectos de las superficies metálicas sobre la dispersión Raman se utilizaron soluciones de benceno y piridina de concentraciones 1 y 2 M mezcladas con coloides de oro y plata obtenidos por ablación láser de láminas del metal, en proporciones 1:2, 1:3 y 1:1 analito-coloide.

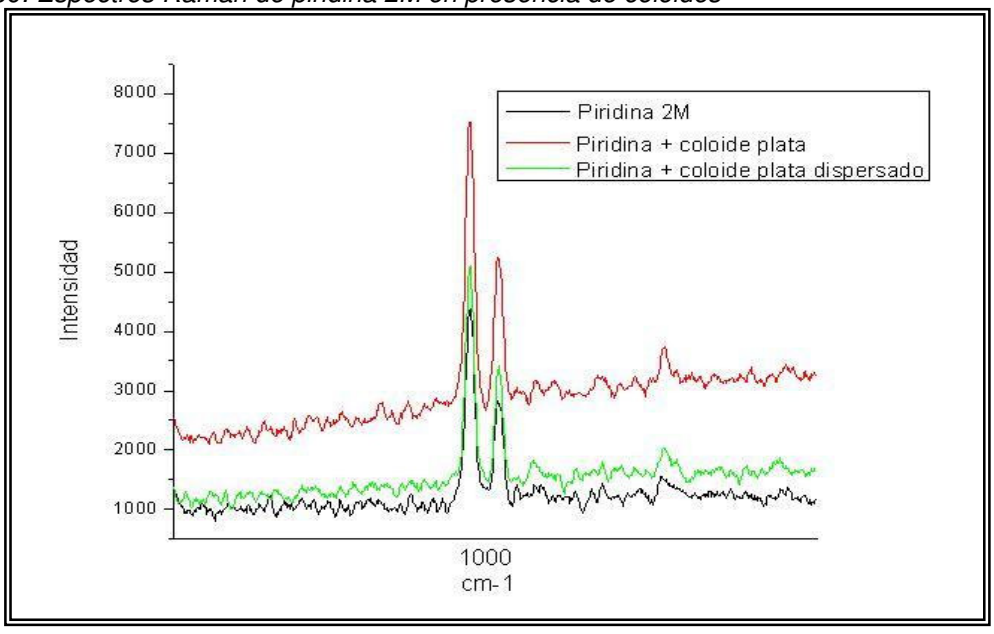
La figura 38 muestra espectros Raman de Benceno 1M, en presencia de coloides de plata de diferentes concentraciones, producto de la dilución del coloide obtenido por ablación láser a la mitad y a una cuarta parte de su concentración inicial, C; la concentración final de Benceno en todos los casos fue 1M.

Figura 38. *Espectros Raman de benceno 1M en presencia de coloides*



En el caso de las soluciones de piridina mezcladas con coloides, en donde la concentración final es 1M, la presencia de la nanoestructura no modifica apreciablemente la intensidad de las señales Raman, como se puede ver en la figura 39.

Figura 39. *Espectros Raman de piridina 2M en presencia de coloides*



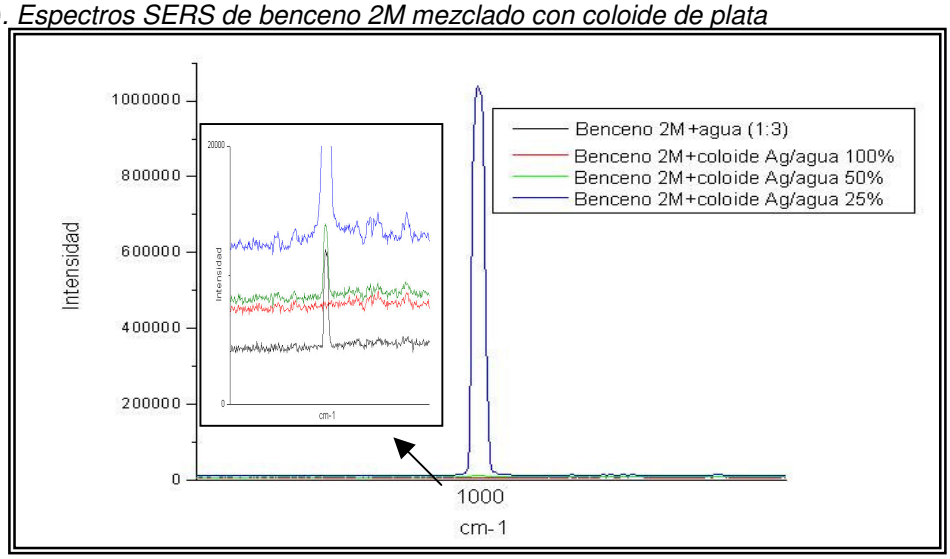
Aunque estamos observando la señal Raman en los compuestos y en mezcla con los coloides, no ha sido posible hasta ahora verificar el efecto de la interacción de fluoróforos con nanoestructuras metálicas. Consideramos que en estas circunstancias interviene fundamentalmente la imposibilidad de utilizar concentraciones muy bajas de los analitos que corresponden, naturalmente, a señales Raman normales demasiado débiles para ser detectada bajo las condiciones limitadas de nuestro detector.

La elevada señal de fondo impide la detección de señales débiles y limita el tiempo de registro en nuestros experimentos; de tal manera, que solo es posible obtener la señal Raman en concentraciones relativamente elevadas comparadas con las concentraciones con las que normalmente son reportados los efectos SEF y SERS (10^{-6} -10^{-10}M), concentraciones en las cuales la interacción fluoróforo-nanopartícula debe ser detectable. Bajo nuestras concentraciones (1 y 2M) seguramente el número de moléculas de analito se aglomeran de tal manera sobre las nanopartículas, que es imposible esperar ver el efecto de la interacción.

Solo en una ocasión se observó un aumento en la intensidad, que parecería corresponder al efecto que se esta buscando, pero este resultado no se pudo repetir, a pesar, de múltiples intentos.

Otro factor que distorsiona notablemente nuestras señales espectroscópicas es la aparición de radiación espúrea del láser; normalmente los sistemas Raman usan filtros antes de la excitación para garantizar una línea láser pura. Así mismo, se usa un filtro para la línea Rayleigh en el sitio de detección, la cual, por su alta intensidad hace que las señales Raman no sean apreciables. En este trabajo aunque sintonizamos el detector en ventanas espectrales en las cuales no apareciera la línea Rayleigh; esta sin embargo, ingresa al espectrómetro y probablemente esto también afecta la observación de señales espectroscópicas.

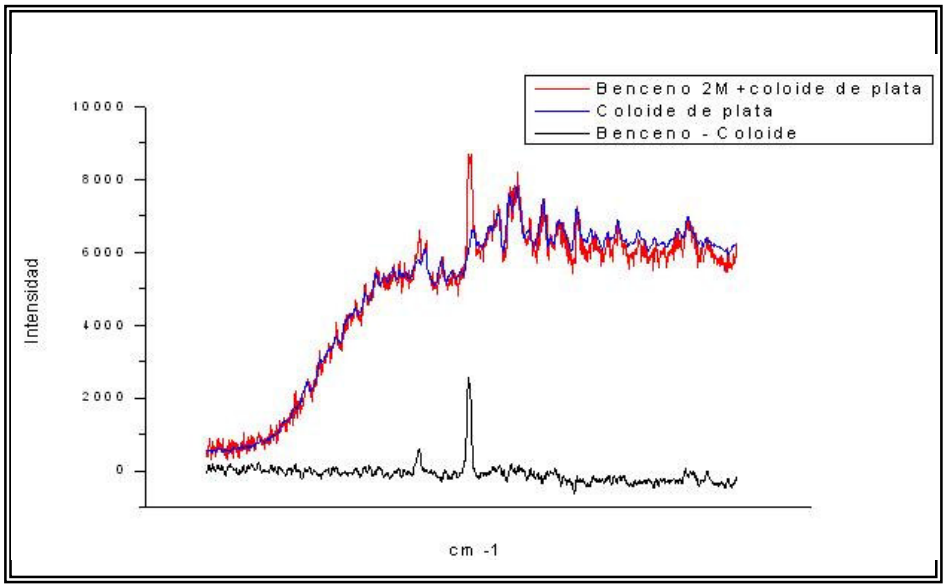
Figura 40. *Espectros SERS de benceno 2M mezclado con coloide de plata*



Otro factor que distorsiona notablemente nuestras señales espectroscópicas es la aparición de radiación espúrea del láser; normalmente los sistemas Raman usan filtros antes de la excitación para garantizar una línea láser pura. Así mismo, se usa un filtro para la línea Rayleigh en el sitio de detección, la cual, por su alta intensidad hace que las señales Raman no sean apreciables. En este trabajo aunque sintonizamos el detector en ventanas espectrales en las cuales no apareciera la línea Rayleigh; esta sin embargo, ingresa al espectrómetro y probablemente esto también afecta la observación de señales espectroscópicas.

En general cuando se toman los espectros en presencia del coloide, se observa un fondo espectral considerable; por esta razón, todos los espectros han sido sometidos a una resta del espectro obtenido para los coloides; la figura 40, muestra el efecto del fondo del coloide sobre el espectro Raman.

Figura 41. *Espectros Raman de Benceno 2M en presencia de coloide de plata*



4. CONCLUSIONES

Este trabajo se enmarca en el contexto de un proyecto para el estudio del efecto de plasmones superficiales sobre el comportamiento espectroscópico (Fluorescencia y dispersión Raman) de moléculas.

Consideramos que aquí se ha hecho un importante aporte; el diseño e implementación de un sistema espectroscópico para SEF y SERS utilizando para ello, los materiales disponibles en el laboratorio. Con este sistema, es posible obtener espectros de fluorescencia inducida por láser, dispersión Raman, SEF y SERS; estos últimos, mediante la interacción con superficies metálicas apropiadas. Una de las ventaja de este sistema, es que utiliza pequeños volúmenes para el análisis espectral, tan solo 10μL, y pequeño número de moléculas, del orden de 10^{10} a 10^{15} moléculas aproximadamente en Fluorescencia con soluciones de concentraciones de ~10^{-8}M a ~10^{-3}M y en el caso de Raman 10^{18} moléculas con soluciones de concentraciones 1 y 2M. Con este sistema se obtuvieron espectros de fluorescencia y Raman de diferentes moléculas.

Se prepararon superficies metálicas para la generación del efecto SEF y SERS, coloides de oro y plata y películas islas y autoensambladas de plata, por diferentes métodos que exhibieron en el espectro UV-Vis las bandas esperadas para los plasmones superficiales.

No se logró observar de manera repetible la modificación de las señales espectrales asociadas con la interacción plasmónica, en el caso de la fluorescencia se espera intensificación; por el contrario, en la mayoría de ensayos los procesos de apagamiento fueron los que predominaron; este apagamiento se atribuye a la proximidad de los fluoróforos a las partículas metálicas, induciendo procesos de transferencia de energía que atenúan las señales.

El efecto de aumento de la intensidad de las señales Raman por interacción con nanopartículas metálicas no se pudo obtener de manera repetible, ya que el sistema de detección usado no es el más apropiado por su sensibilidad; y en nuestro caso, trabajando en ausencia de refrigeración, ya que el alto ruido térmico del fondo limita la detección. Además, el sistema experimental carece de los filtros para la señal de entrada, que garantiza la pureza de la línea láser y de filtros para la línea Rayleigh en el sitio de detección, que por su intensidad dificulta la observación de las señales. Por otro lado, se puede suponer que la baja pureza de los coloides también influyo en la no observación de SERS; estos fueron preparados con materiales comerciales que contenían impurezas de otros metales; estas impurezas pueden afectar los espectros SERS y los efectos de interacción plasmónica.

5. RECOMENDACIONES

Usar un detector CCD intensificado (ICCD), que permita la observación de señales Raman de bajas concentraciones.

Usar los filtros necesarios para la radiación láser de entrada y para la radiación Rayleigh en el sitio de detección.

Implementar métodos de fabricación de películas autoensambladas que permitan controlar la distancia analito-metal, parámetro crítico del cual depende la observación del efecto de intensificación de la fluorescencia.

Aunque es deseable el trabajo con oro y plata comerciales; posiblemente para una verificación de los efectos SEF Y SERS, seria necesario, por lo menos, en una primera instancia, preparar los coloides a partir de metales de elevada pureza y a partir de la comparación con los “comerciales” determinar el grado de eficacia de la utilización de los últimos en el proceso.

Bajo estas condiciones se recomienda continuar con este trabajo, pues las técnicas SEF y SERS poseen muy importantes posibilidades de aplicación; de interés y gran utilidad en diferentes áreas, tanto para los grupos de investigación UIS como para el desarrollo de ciencia y tecnología en el país.

BIBLIOGRAFIA

1. SKOOG, D. A. and LEARY, J.J. Analisis Instrumental. Editorial McGraw Hill. Cuarta Edición. Madrid. (1994)

2. LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Khiwer Academic Plenum Publishers. Segunda edición. New York. (1999)

3. LAKOWICZ, J.R. et al. Intensified Fluorescence. En: Photonics Spectra. p. 96-104 (Oct. 2001)

4. LAKOWICZ, J.R. et al. Advances in Surface-Enhanced Fluorescence. En: Journal of Fluorescence. Vol. 14, No. 4. p. 425-441 (2004)

5. GARAVAGLIA M. El láser. Organización de Estados Americanos. Secretaria Washintong D.C. (1976)

6. BERMEJO, D. Introducción a la Espectroscopia Raman. Serie de monografías de la OEA. Washington D.C. (1988)

7. LAKOWICZ, J.R. Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission. En: Analytical Biochemistry. Vol. 337. p. 171-194 (2005)

8. ASLAN, K. et al. Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology. En: Current opinion in Biotechonology. Vol. 16. p. 55-62 (2005)

9. LAKOWICZ, J.R. et al. Intensified Fluorescence. En: Photonics Spectra. p. 96-104 (Oct. 2001)

10. LAKOWICZ, J.R. et al. Advances in Surface-Enhanced Fluorescence. En: Journal of Fluorescence. Vol. 14, No. 4 p. 425-441 (2004)

11. MALICKA, J. et al. Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine–dye-labeled oligonucleotides. En: Analytical Biochemistry. Vol. 315. p. 57-56 (2003)

12. KAWASAKI, M. and SHUKI M. Enhanced Molecular Fluorescence near Thick Ag Island Film of Large Pseudotabular Nanoparticles. En: Journal of Physical Chemistry B. Vol. 109. p. 17254-17261 (2005)

13. LAKOWICZ, J.R. Radiative decay engineering 3: Surface plasmon-coupled directional emission. En: Analytical Biochemistry. Vol. 324. p. 153-169 (2004)

14. LIEBERMANN, T; KNOLL, W; SLUKA, P. and HERRMANN, R. Complement hybridization from solution to surface-attached probe-oligonucleotides observed by surface-plasmon-field-enhanced fluorescence spectroscopy. En: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Vol. 169. p. 337-350 (2000)

15. HAYAKAWA, T.; SELVAN, S. T. and NOGAMI, M. Enhanced fluorescence from Eu^{+3} owing to surface plasma oscillation of silver particles in glass. En: Journal of Non-Crystalline Solids. Vol. 259. p. 16-22 (1999)

16. ZHU, J. Enhanced fluorescence from Dy^{+3} owing to surface plasmon resonance of Au colloid nanoparticles. En: Material Letters. Vol. 59. p. 1413-1416 (2005)

17. ANDONG, X. et al. Enhancement of fluorescence and Raman spectroscopies of undoped C_{60} film. En: Journal of Luminescence. Vol. 63. p. 301-308 (1995)

18. GRYCZYNSKI, I. et al. Multiphoton excitation of fluorescence near metallic particles: Enhanced and localized excitation. En: Journal of Physical Chemistry B. Vol. 106. p. 2191-2195 (2002)

19. FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P.J.; MCQUILLAN, A.J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. En: Chemical Physics Letters. Vol. 26. p. 163-166 (1974)

20. GARCIA-RAMOS, J.V. Mecanismo electromagnético del efecto SERS. En: Óptica pura y aplicada. Vol. 37. Número 2. p. 17-22 (2004)

21. MING LIU, F. et al. A note on distance dependence in surface enhanced Raman spectroscopy. En: Chemical Physics Letters. Vol. 430. Número. 1-3. p. 173-176 (2006)

22. Ye, Q.; Fang, J.; Sun, L. Surface-Enhanced Raman Scattering from Functionalized Self-Assembled Monolayers. 2. Distance Dependence of Enhanced Raman Scattering from an Azobenzene Terminal Group. En: Journal of Physical Chemistry B. Vol. 101. p. 8221-8224 (1997)

23. GARCIA-RAMOS, J.V. Mecanismo químico en SERS. En: Óptica pura y aplicada. Vol. 37. Número 2. p. 23-32 (2004)

24. LEE, P.C. and MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. En: Journal of Physical Chemistry. Vol. 86. p. 3391-3395 (1982)

25. CREIGHTON, J.A.; BLATCHFORD, C.G. and ALBRECHT, M.G. Plasma resonance enhancement of Raman Scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. En: Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics. Vol. 75. p. 790-798 (1979)

26. Chemistry webBook. NIST Standard Reference Database [on line]. United States of America: National Instute of Standards and Technology, 2005. Disponible en Internet: http://webbook.nist.gov/chemistry/

27. BROLO, A.G.; IRISH, D.E. and LIPKOWSKI, J. Surface-Enhanced Raman Spectra of Pyridine and Pyrazine Adsorbed on a Au(210) Single-Crystal Electrode. En: Journal of Physical Chemistry B. Vol. 101. p. 3906-3909 (1997)