

UCH-FC  
DOC-a  
0837  
C.1

# **Superficies Metálicas para Estudios de Fluorescencia Amplificada por Superficie (SEF)**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile en cumplimiento parcial  
de los requisitos para optar  
al grado de  
Doctor en Química



**Igor Orlando Osorio Román**

**Director: Prof. Ricardo Aroca**  
**Director: Prof. Víctor Vargas C.**

**Santiago, Junio 2007**

**Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile  
Informe de Aprobación  
Tesis Doctoral**

Se informa a la escuela de postgrado de la facultad de ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**Igor Orlando Osorio Román**

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de defensa rendido el día 19 de marzo del 2007.

**Director de Tesis:**

Dr. Ricardo Aroca

**Director de Tesis:**

M. Cs. Víctor Vargas C.

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Guillermo González (Presidente)

Dr. Marcelo Campos

Dr. Julio De la Fuente

Dra. María Victoria Encina

Dr. Hernán Pessoa

.....  
*Vargas*  
.....

.....  
*Guillermo González*  
.....

.....  
*M. V. Encina*  
.....

.....  
*Hernán Pessoa*  
.....





*Esto es obra de nuestra ardiente paciencia*

*Con todo mi amor para mi familia...*

*Kelsey Dewar, Natalia Osorio, Adolfo Osorio y Mery Román*



Nací un jueves 13 de julio del 1978 a las 20:30 horas, mi llegada fue un gran acontecimiento, ya que sería el 1<sup>er</sup> sobrino y nieto de una gran familia. Mi madre era la más contenta, ya que la jodí durante los 9 meses de gestación. Mis genes provienen de dos grandes personas Adolfo Orlando Osorio Lepe y Maria Elena Román Díaz. Además tengo una hermana a la cual cariñosamente cuando niño, le apodé *la conconina*...

este apodo permanecerá como marca registrada familiar.

Mis primeros años de escolaridad los realicé en el Colegio La Florida, donde me destaque entre mis compañeros por hacer valer los derechos del niño, ya que no acepté que una profesora lavara mi boca con jabón, por decir una grosería, que era justa y necesaria en ese momento.

Después entre alegría, curiosidad y novedad partí con mi familia a Puebla, México, en busca de nuevas oportunidades de trabajo para mis papas. Entre tortillas, tacos, mayas y aztecas conocí a Montezuma, Pancho Villa, Benito Juárez y Frida Calo, personajes que marcaron mi incipiente adolescencia. Además en este hermoso país, cultivé grandes amigos, que felizmente todavía conservo.

De vuelta en Chile en el año 1993 ingresé al Liceo de Aplicación para cursar mi enseñanza media y fué en este periodo donde comencé a practicar mi deporte favorito, en la Rama de Natación de la Universidad de Chile, donde las medallas no me faltaron. Al finalizar mi 4<sup>to</sup> año medio se me otorgó un premio por ser uno de los 10 alumnos más destacados de mi promoción.

Al año siguiente ingresé a la Universidad de Chile a la Carrera de Química Ambiental, allí pasaré 5 años de mi vida. Mis amigos crecieron en este espacio infinito de conocimiento... entre libros y formulas, entre el portero de la universidad, carreras a las competencias de natación universitaria, pruebas, etc. Además en esta casa de estudios conocí a un profesor que el azar puso en mi camino y que me permitió ingresar al mundo de la ciencia, su nombre Víctor Vargas.

Al finalizar mi carrera, cambié bruscamente de enfoque profesional, ya que ingresé al programa de doctorado en química de la facultad de ciencias y después de un extenuante año académico, comencé mi búsqueda por la verdad. En esta pesquisa tengo la oportunidad de viajar a Canadá, a la Universidad de Windsor para desarrollar parte de mi proyecto de investigación. Allí conocí a grandes científicos como el profesor Ricardo Aroca, de quien no solo aprendí el rigor de la ciencia de primer mundo, sino que además la visión de un hombre que vivió y fue parte del proceso político más relevante en la historia de Chile. También este viaje me permite conocer a una persona muy especial, Kelsey Dewar.

Actualmente defendiendo mi tesis doctoral y creo que mi vida académica no termina aquí, al contrario es el inicio de más historias por contar...

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos cada uno de los integrantes de la comisión de mi tesis doctoral, por su apoyo técnico y científico a la hora de ordenar mis ideas y en la corrección de mi trabajo. De manera individual, agradezco al director en Chile, Profesor Víctor Vargas, por su compromiso, apoyo y paciencia a lo largo de estos 5 años.

Al director internacional el Dr. Ricardo Aroca, por su apoyo a la distancia, consejos, discusiones y mucha ciencia. A cada uno de los integrantes del Materials and Surface Science Group, Paul, Nick, David, Ramón, Marta y Daniel por apoyo científico y por soportar mi terrible inglés. A la University of Windsor por su soporte en mi estadía de investigación. A todos y cada uno de los personajes que conocí y conoceré en Canadá, turcos, alemanes, latinos, griegos, canadienses, hindúes, bielorrusos, rusos, americanos, etc... por su respeto a mi persona y a mis ideales de vida.

A mi familia, paterna y materna por su comprensión, ya que no me fue posible asistir a todos los encuentros familiares por mi trabajo, ya sea asados, bautizos, bodas, etc... También a mis más cercanos Adolfo, Mery mis padres, quienes nunca dudaron de mi capacidad y sin ser científicos se percataron que en todos lados se cuecen habas... si aquí también.

A mi hermana *la conconina* que en la distancia sigue la senda del Che y Allende, médicos con conciencia social, no solo para ganar dinero.

A mis amigos Claudio, Mario, Alejandro, Gloria, Panchito, Marcelo, Álvaro, Natacha, Alejandra y Carola por su comprensión en cada una de las instancias de mi vida... nos vemos poco, pero el tiempo suficiente.

A mi amigo el toro Mardones, quien me presto su oreja y experiencia en los momentos más difíciles de mi carrera como investigador.

Por ultimo quiero agradecer a Kelsey, por sus clases de inglés y su incondicional amor...



# ÍNDICE TEMÁTICO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY .....	xvi
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS E HIPÓTESIS .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 ANTECEDENTES GENERALES .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2 INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Modelo electromagnético para esfera .....	12
2.2.1.1 Vector de Poynting.....	15
2.2.2 Propiedades ópticas para nanopartículas.....	21
2.2.2.1 El formalismo de Beer-Lambert.....	25
2.2.2.2 Sección geométrica de absorción y dispersión.....	27
2.2.3 Mecanismos de disipación de energía para nanopartículas metálicas .....	29
2.2.4 Fabricación de sustratos metálicos.....	31
<b>2.3 INTERACCIÓN ENTRE EL CAMPO ELECTROMAGNÉTICO, SUPERFICIE METÁLICA Y MOLÉCULAS .....</b>	<b>32</b>
2.3.1 Espaciadores para el control de la distancia.....	35
<b>2.4 CINÉTICA DE DESACTIVACIÓN DE UN FLUORÓFORO EN PRESENCIA DE NANOESTRUCTURA METÁLICA .....</b>	<b>37</b>
<b>2.5 FACTOR DE AMPLIFICACIÓN (FA) .....</b>	<b>40</b>
<b>2.6 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>42</b>
<b>2.7 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>46</b>
2.7.1 Objetivos generales.....	47
2.7.2 Objetivos específicos .....	47



<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 REACTIVOS, PREPARACIÓN DE SUPERFICIES Y MUESTRAS .....</b>	<b>49</b>
3.1.1 Sistemas moleculares .....	49
3.1.2 Preparación de nanopartículas metálicas .....	51
3.1.3 Preparación de películas metálicas.....	52
3.1.4 Preparación de películas metálicas por evaporación.....	53
<b>3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ESPECTROSCOPIA AMPLIFICADA POR SUPERFICIE .....</b>	<b>54</b>
3.2.1 Uso del polivinil formal (Formvar) como espaciador.....	54
<b>3.3 INSTRUMENTOS.....</b>	<b>59</b>
3.3.1 Estudios de fluorescencia y fluorescencia amplificada por superficie (SEF) .....	59
3.3.2 Estudios cinéticos.....	64
3.3.3 Espectroscopía de absorción UV-VIS.....	68
3.3.4 Microscopía electrónica .....	68
3.3.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM) .....	68
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 CARACTERIZACIÓN UV-VISIBLE DE LOS COLOIDES DE PLATA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LOS COLOIDES DE PLATA .....</b>	<b>70</b>
4.1.1 Estudio estadístico de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata en solución .....	74
<b>4.2 CARACTERIZACIÓN UV-VISIBLE Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS SUPERFICIES DE PLATA .....</b>	<b>76</b>
4.2.1 Estudio estadístico de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata sobre vidrio .....	80
4.2.2 Caracterización vibracional del sustrato de plata recubierto con moléculas orgánicas .....	83
<b>4.3 CARACTERIZACIÓN UV-VISIBLE Y AFM DE LAS SUPERFICIES DE PLATA PREPARADAS A ALTO VACÍO .....</b>	<b>88</b>
4.3.1 Estudio estadístico de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata sobre vidrio .....	90
<b>4.4 ESPECTROS DE EXTINCIÓN TEÓRICOS.....</b>	<b>91</b>
<b>4.5 CONCLUSIONES .....</b>	<b>95</b>



<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>FLUORESCENCIA DE RODAMINA-B AMPLIFICADA POR SUPERFICIE DE PLATA-ÁCIDO GLUCÓNICO. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>96</b>
<b>5.1 FLUORESCENCIA AMPLIFICADA POR SUPERFICIE DE RODAMINA-B.....</b>	<b>98</b>
5.1.1 Tiempo de depósito de nanopartículas sobre vidrio.....	107
5.1.2 Cinética de desactivación del primer estado excitado electrónico de Rodamina-B .....	113
<b>5.2 CONCLUSIONES.....</b>	<b>120</b>
<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA AUMENTADA POR SUPERFICIES PARA FENIL-TRIEENOS A BAJA TEMPERATURA. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>123</b>
<b>6.1 ESTUDIOS DE AMPLIFICACIÓN A BAJA TEMPERATURA PARA DM-DPH Y DM-PTC.....</b>	<b>125</b>
6.1.1 Estudio de amplificación con superficies de Plata-ácido glucónico .....	129
6.1.2 Estudio de amplificación con diferentes superficies de Plata-ácido glucónico .....	134
<b>6.2 CONCLUSIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>CAPÍTULO 7</b>	
<b>ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA AUMENTADA POR SUPERFICIES. ESTUDIOS CON FENIL-TRIEENOS. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>141</b>
<b>7.1 ESTUDIOS SEF USANDO COMO ESPACIADOR A FORMVAR .....</b>	<b>142</b>
7.1.1 Estudios de amplificación en diferentes superficies metálicas .....	150
7.1.2 Estudios cinéticos de los Fenil-trieenos sobre distintas superficies metálicas .....	155
<b>7.2 CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>8.0 CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>161</b>
<b>9.0 PROYECCIONES.....</b>	<b>164</b>
<b>10.0 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>165</b>
<b>11.0 ANEXOS .....</b>	<b>172</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPITULO 2

<i>Figura 2.1 Arreglo experimental típico para estudios de espectroscopia aumentada por superficies</i> .....	8
<i>Figura 2.2 Esquema de excitación de una nanopartícula metálica y generación de la oscilación colectiva de los electrones</i> .....	10
<i>Figura 2.3 Flujo de energía electromagnética</i> .....	17
<i>Figura 2.4 Modelo que describe el efecto de la distancia metal-molécula</i> .....	33
<i>Figura 2.5 Arreglo experimental molécula-metal con espaciador</i> .....	35
<i>Figura 2.6 Procesos cinéticos de desactivación del estado excitado de un fluoróforo</i> .....	39
<i>Figura 2.7 Publicaciones en el área de la espectroscopia amplificada por superficies</i> .....	42

### CAPITULO 3

<i>Figura 3.1 Estructuras de la serie Fenil-hexatrieno</i> .....	50
<i>Figura 3.2 Estructura molecular de Rodamina-B</i> .....	50
<i>Figura 3.3 Esquema del sistema mecánico utilizado para la fabricación de películas delgadas de polímero</i> .....	55
<i>Figura 3.4 Relación entre espesor de la película y concentración de Formvar en cloroformo</i> .....	56
<i>Figura 3.5 Esquema de muestras para estudios de fluorescencia amplificada por superficie</i> .....	57
<i>Figura 3.6 Esquema del equipo de fluorescencia</i> .....	60
<i>Figura 3.7 Compartimiento de muestra para iluminación frontal</i> .....	60
<i>Figura 3.8 Esquema del sistema micro-Raman empleado en las mediciones</i> .....	62
<i>Figura 3.9 Fotografía del equipo Raman Renishaw Research RM2000</i> .....	62
<i>Figura 3.10 Esquema del dispositivo para el control de la temperatura</i> .....	63
<i>Figura 3.11 Diagrama de desfase (<math>\phi</math>) y razón de modulación (<math>m</math>) medido entre la onda de excitación y emisión</i> .....	64
<i>Figura 3.12 Datos de tiempo de vida de Rodamina-B en etanol, en función de la frecuencia, la fase <math>\phi</math> (<math>\blacktriangle</math>) y modulación <math>m</math> (<math>\bullet</math>)</i> .....	67



## CAPITULO 4

<i>Figura 4.1 Espectros de extinción de coloides de plata-hidroxilamina y plata glucosa</i> .....	71
<i>Figura 4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) del coloide de plata-hidroxilamina</i> .....	72
<i>Figura 4.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) del coloide plata-glucosa</i> .....	73
<i>Figura 4.4 Histogramas de distribución de tamaños para el coloide de plata-hidroxilamina (a) <sup>69</sup> y coloide de plata-glucosa (b)</i> .....	74
<i>Figura 4.5 Espectros de extinción para nanopartículas en solución coloidal y depositada sobre vidrio de plata-hidroxilamina</i> .....	76
<i>Figura 4.6 Espectros de extinción para nanopartículas en solución coloidal y depositada sobre vidrio de plata-glucosa</i> .....	77
<i>Figura 4.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM) para la superficie de plata-hidroxilamina</i> .....	78
<i>Figura 4.8 Microscopía electrónica de barrido (SEM) del sustrato de plata-glucosa</i> .....	79
<i>Figura 4.9 Histograma de distribución de tamaños para la solución coloidal de plata-hidroxilamina (a) y de la superficie de plata-hidroxilamina (b)</i> ... 80	
<i>Figura 4.10 Histograma de distribución de tamaños para la solución coloidal de plata-glucosa (a) y de la superficie de plata-glucosa (b)</i> .....	81
<i>Figura 4.11 Espectro SERS de la superficie de la Plata-ácido glucónico (a) y espectro Raman de cristales de ácido glucónico (b)</i> .....	84
<i>Figura 4.12 Espectro Raman de la superficie metálica y espectro Raman calculado para una molécula de ácido glucónico y dos átomos de plata</i> .....	85
<i>Figura 4.13 Modelo del sustrato de Plata-ácido glucónico (Ag-aglu)</i> .....	87
<i>Figura 4.14 Espectro de extinción de una película de 5 nm de plata</i> .....	88
<i>Figura 4.15 AFM de superficie de plata evaporada</i> .....	89
<i>Figura 4.16 Histograma de distribución de tamaños para la superficie evaporada de plata</i> .....	90
<i>Figura 4.17 Sección eficaz geométrica para una nanopartícula esférica de 30 nm en aire</i> .....	92
<i>Figura 4.18 Sección eficaz geométrica para una nanopartícula esférica de 80 nm en aire</i> .....	92
<i>Figura 4.19 Sección eficaz geométrica nanopartícula elipsoidal en aire</i> .....	94



## CAPITULO 5

<i>Figura 5.1 Espectro de emisión de Rodamina-B en solución y sobre vidrio.....</i>	<i>99</i>
<i>Figura 5.2 Espectro de absorción en solución y en estado sólido de Rodamina-B.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 5.3 Espectros de absorción de Rodamina-B sobre vidrio y sobre plata-ácido glucónico.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 5.4 Espectro de fluorescencia de Rodamina-B en vidrio y sobre el sustrato de plata-ácido glucónico .....</i>	<i>102</i>
<i>Figura 5.5 Espectro Raman (SERS) del sustrato de Ag-citrato y del sustrato Ag-aglu.....</i>	<i>104</i>
<i>Figura 5.6 Modelo para la interacción de succinato con plata sobre vidrio .....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 5.7 Espectros de fluorescencia de Rodamina-B depositada sobre diferentes tipos de superficies metálicas.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 5.8 Efecto del tiempo de depósito del coloide sobre vidrio funcionalizado .....</i>	<i>108</i>
<i>Figura 5.9 Microscopía de fuerza atómica (AFM) de superficie de Ag-aglu a 6 horas (a), 12 horas (b), 24 horas y 36 horas .....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 5.10 Aumento de la extinción a 514.5 nm en función del tiempo de depósito de nanopartículas de plata-ácido glucónico.....</i>	<i>110</i>
<i>Figura 5.11 Espectros de fluorescencia de Rodamina-B sobre superficie de plata-ácido glucónico obtenida a diferentes tiempos de depósito.....</i>	<i>111</i>
<i>Figura 5.12 Factor de amplificación en función de tiempo de depósito de nanopartículas sobre vidrio.....</i>	<i>111</i>
<i>Figura 5.13 Aumento de tamaño de las nanopartículas de plata depositadas sobre vidrio funcionalizado .....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 5.14 Campo electromagnético generado en la superficie de la esfera en función del tamaño de la nanopartículas.....</i>	<i>119</i>



## CAPITULO 6

<i>Figura 6.1 Espectros UV-visible en estado sólido y en solución para DM-DPH y DM-PTC</i> .....	126
<i>Figura 6.2 Espectros de fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC en fase sólida en función de la temperatura</i> .....	128
<i>Figura 6.3 Espectros de fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC a 93 °K sobre superficie de plata-ácido glucónico</i> .....	130
<i>Figura 6.4 Concentración de moléculas en función del factor de amplificación</i> .....	131
<i>Figura 6.5 Espectros de fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC sobre la superficie de plata-ácido glucónico (con separador) y sobre superficie de plata evaporada al vacío (sin separador)</i> .....	133
<i>Figura 6.6 Extinción a 442 nm en función del tiempo de depósito de plata-ácido glucónico</i> .....	134
<i>Figura 6.7 Espectros de fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC depositados sobre superficies de plata-ácido glucónico obtenido con diferentes tiempos de depósito</i> .....	135
<i>Figura 6.8 Dependencia del factor de amplificación de la fluorescencia con el tiempo de depósito de nanopartículas</i> .....	137

## CAPITULO 7

<i>Figura 7.1 Esquema de superficies metálicas de plata recubiertas con polivinil formal (Formvar)</i> .....	143
<i>Figura 7.2 Espectros de extinción de superficies metálicas con y sin polímero</i> .....	144
<i>Figura 7.3 Espectros de extinción para una nanopartícula de plata en aire y polímero</i> .....	145
<i>Figura 7.4 Arreglo experimental usando polímero como espaciador metal-molécula</i> .....	146
<i>Figura 7.5 Espectro de absorción de DPH sobre vidrio y espectros de DPH depositado sobre diferentes superficies metálicas</i> .....	147
<i>Figura 7.6 Espectro de absorción de DM-DPH sobre vidrio y espectros de DM-DPH depositado sobre diferentes superficies metálicas</i> .....	148
<i>Figura 7.7 Espectro de absorción de DM-PTC sobre vidrio y espectros de DM-PTC depositado sobre diferentes superficies metálicas</i> .....	148
<i>Figura 7.8 Determinación del ángulo para iluminación frontal</i> .....	150



<i>Figura 7.9 Espectros de fluorescencia de DPH sobre diferentes superficies de plata.....</i>	<i>151</i>
<i>Figura 7.10 Espectros de fluorescencia de DM-DPH sobre diferentes superficies de plata.....</i>	<i>151</i>
<i>Figura 7.11 Espectros de fluorescencia de DM-PTC sobre diferentes superficies de plata.....</i>	<i>152</i>

## **INDICE DE TABLAS**

<i>Tabla 5.1 Tiempos de vida para Rodamina-B .....</i>	<i>113</i>
<i>Tabla 7.1 Factor de amplificación obtenido empleando diferentes superficies de plata con Formvar .....</i>	<i>153</i>
<i>Tabla 7.2 Estudio cinético para Fenil-trienos en polímero y en solución.....</i>	<i>155</i>
<i>Tabla 7. 3 Rendimiento de emisión para Fenil-trienos en polímero y solución.....</i>	<i>157</i>
<i>Tabla 7. 4 Tiempos de vida para Fenil-trienos sobre superficies metálicas .....</i>	<i>158</i>



## SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Å	Amstrong
<sup>o</sup> C	Celsius
K	Kelvin
M	Molaridad
dm	Diámetro de nanopartícula
$\lambda$	Longitud de onda
$\epsilon_m$	Constante dieléctrica relativa del metal
$\epsilon_o$	Constante dieléctrica relativa del medio
$\omega_{ex}$	Frecuencias de excitación
$\omega_{em}$	Frecuencias de emisión
$\phi$	Potencial eléctrico
$\nabla\phi$	Gradiente del potencial eléctrico
$\mu$	Densidad de energía media
$\vec{S}$	Vector de pointing
$\Delta t$	Intervalo pequeño de tiempo
$C_{abs}$	Sección geométrica para absorción
$C_{sca}$	Sección geométrica para scattering
E	Probabilidad de absorción
$E_{me}$	Probabilidad de absorción aumentada por el metal
$\Gamma$	Decaimiento radiativo
$\Gamma_{me}$	Decaimiento radiativo por efecto del metal
$k_{nr}$	Decaimiento no radiativo de la molécula
$k_{nr(me)}$	Decaimiento no radiativo de la molécula debido al metal
$\tau_o$	Tiempo de vida (fluorescente)
$\tau_{me}$	Tiempo de vida (fluorescente) con metal
c	Velocidad de la luz
I	Intensidad de emisión
$\phi$	Desfase de la frecuencia
m	Modulación de la frecuencia
$\chi^2_{red}$	Chi cuadrado reducido
$P_\omega$	Corrimiento de fase
$M_\omega$	Relativo a la modulación
$\sigma_P$	Desviaciones de estándar de cada valor medido de fase
$\sigma_M$	Desviaciones de estándar de cada valor medido de modulación
g	gramos
ml	mililitros
$\mu l$	microlitros
DPH	Difenilhexatrieno
DM-DPH	1-[4-(dimetilamino)fenil]-6-fenilhexatrieno
DM-PTC	1-[4-(dimetilamino)fenil]-6-hexatrienona
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica

APS	3-Aminopropiltriétoxissilano
B-3LYP	Funcional de intercambio de tres parámetros de Becker con ajuste de Lee-Yang-Parr
DFT	Teoría de funcional de densidad
CCD	Charge-coupled device (Detector)
EM	Electromagnético
$E_0$	Campo eléctrico de excitación
$E_l$	Campo eléctrico generado por la superficie
$E$	Campo eléctrico total
$E_F$	Nivel de fermi
FA	Factor de Amplificación
IR	Infrarrojo
LB	Langmuir-Blodgett
MEF	Metal-Enhanced Fluorescence
SEM	Scanning Electron Microscope
SES	Surface Enhanced Spectroscopy
SEF	Surface Enhanced Fluorescence
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy
SERRS	Surface Enhanced Resonante Raman Spectroscopy
p/p	Concentración peso/peso

## RESUMEN

La presente tesis se centró en la obtención de superficies metálicas, cuya principal característica es el recubrimiento inerte que permite separar al sistema molecular fluorescente de la superficie metálica.

La síntesis de la superficie metálica implica un proceso redox entre nitrato de plata y glucosa en medio básico, para generar una solución coloidal de plata. Las partículas metálicas estabilizadas en solución son depositadas sobre vidrio.

La caracterización de estas superficies se lleva a cabo mediante espectroscopía UV-Visible, Microscopía Electrónica de alta Resolución (SEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y espectroscopía Raman. Los resultados de microscopía electrónica determinaron que las nanopartículas sintetizadas en solución están en un amplio rango de tamaño, 30 a 200 nm, mientras que el tamaño de las nanopartículas depositadas sobre vidrio está entre 60 y 500 nm. La caracterización Raman de esta superficie confirma que las nanopartículas de plata quedan recubiertas con una capa protectora de ácido glucónico, residuo <sup>σ</sup> proveniente de la reacción redox de nitrato de plata y glucosa. Además, este resultado fue ratificado a través de cálculos moleculares a nivel de funcionales de la densidad (DFT), para un sistema constituido por una molécula de ácido glucónico enlazado a un átomo de plata. De la interacción entre estos dos sistemas fue posible estimar el espesor de la capa protectora en aproximadamente 10 Å.

La nueva superficie metálica es caracterizada y posteriormente empleada en estudios de amplificación de la señal fluorescente de Rodamina-B. Los resultados de este estudio determinó que Rodamina-B depositada sobre nuestra superficie metálica

presenta una intensidad de fluorescencia 15 veces mayor que la señal de fluorescencia medida para este sistema molecular depositado sobre vidrio. Este resultado nos permitió inferir que el espesor de 10 Å, permite tanto minimizar el proceso de transferencia de energía no radiativa desde la molécula al metal y amplificar la emisión.

Una vez probada la efectividad de nuestra superficie metálica con Rodamina-B, se llevaron a cabo estudios de fluorescencia de estado estacionario y fluorescencia dinámica. Las medidas se realizaron a 93K y a temperatura ambiente (298K) con los siguientes sistemas moleculares, difenilhexatrieno (DPH), 1-[4-(dimetilamino)fenil]-6-fenilhexatrieno (DM-DPH) y 1-[4-(dimetilamino)fenil]-6-hexatrienona (DM-PTC), denominados como fenil-trienos. Algunos de los resultados más relevantes encontrados para estos sistemas fueron: a mayor depósito de nanopartículas de plata sobre vidrio mayor es la amplificación de la señal fluorescente; moléculas con un rendimiento cuántico cercano a la unidad tienen una amplificación entre 4 a 5 veces menor, que las moléculas con rendimiento cuántico en torno a 0.1.

Además al emplear superficies metálicas recubiertas con 25 nm de polivinil formal (Formvar) a temperatura ambiente, donde se encontró que los decaimientos radiativos de la intensidad de fluorescencia para los fenil-trienos, se ajustan a decaimientos biexponenciales y en todos los casos la presencia de la superficie metálica genera la disminución del tiempo de vida del primer estado electrónico excitado.

## SUMMARY

There is a rapid development of new synthetic methods to produce nanostructures of different sizes, shape and composition including layer-protected nanoparticles. Layer-protected nanoparticles are most useful when study fluorescence enhancement from metallic surfaces (SEF or MEF). According to the electromagnetic model of SEF, in order to observe the maximum enhancement, the fluorophores must be placed at an optimum distance from the metallic nanostructure. In the present work, layer-protected silver nanoparticles are fabricated using sugar molecules linked through the carboxylic acid head. The synthesis of these layer-protected nanoparticles is performed by a redox reaction in solution using excess sugar, aqueous  $\text{Ag}^+$  and a stoichiometric amount of hydroxide.

The synthesized nanoparticles in solution and thin solid films formed on glass substrates was characterized by UV-visible spectroscopy, transmission electron microscopy, atomic force microscopy and Raman scattering. The results show that synthesized nanoparticles in solution are within a wide range of sizes, ranging from 30-200 nm as confirmed by transmission electron microscopy. The Raman characterization of this surface confirms that nanoparticle's is covered with coating protective of the gluconic acid, remainder of the reaction of nitrate of silver. In addition this result was ratified through molecular calculations at level of density functional theory (DFT), for a system constituted by a connected gluconic acid to a silver atom, with it was considered so much the interaction of the molecule absorbed in the atom of silver like the thickness that generates this protective coating that is of approximately 10 Å.

The surface-enhanced fluorescence with the protected nanoparticles is illustrated with Rhodamine-B as a target molecule. The amplification of the fluorescence signal was found to be 15 fold. A thirty fold enhancement is a notable result for SEF when compared with other findings in the field.

Proven the effectiveness of the metallic surface with Rhodamine-B, were made studies of fluorescence and fluorescence lifetime. The conditions of measurement were 93K and room temperature (298K) with following molecular systems 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (DM-DPH) and 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-hexatrienona (DM-PTC) denominated like phenyltrienes. The results that exists an important dependency between the amounts of silver deposited on the glass and the enhanced of the fluorescent signal: to greater deposit of silver greater is it enhanced of the fluorescent signal. Other results suggest an important dependency between the enhanced factor of the fluorescent signal and the photophysics properties of the fluorophore used. In effect, the molecules with a quantum yield near 1.0 have an enhanced of the fluorescence 4 to 5 less, than molecules with quantum yield around 0.1.

In addition when using covered metallic surfaces with 25 nm of polivinil formal (Formvar) to room temperature, one was that the radiativos decays of the intensity of fluorescence for the phenyltrienes, adjust to an biexponential decay and in all the cases the presence of metallic surfaces generates the diminution of the lifetime of the excited state.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

*Con mi pura habilidad  
me las di de carpintero  
de estucador y albañil  
de gásfiter y tornero,  
pucha que sería güeño  
haber tenio instrucción  
porque de todo elemento  
el hombre es un creador.*

Víctor Jara (1932-1973). Músico, cantautor y director de teatro chileno.

En el ámbito de la espectroscopía molecular, la utilización de superficies metálicas constituidas por partículas de dimensión nanométrica ha generado un aumento sostenido de investigaciones enfocadas a la comprensión de los fenómenos de amplificación de señales ópticas lineales y no lineales, provenientes de sistemas moleculares ubicados en la cercanía de nanoestructuras metálicas<sup>1</sup>.

Una de las primeras experiencias en esta área fue la realizada por Fleischmann y col.<sup>2</sup>, quienes en 1974 observaron un aumento considerable en la intensidad Raman de piridina depositada en un electrodo rugoso de plata, atribuyendo el aumento de la señal a una mayor concentración efectiva producto del aumento en la rugosidad del electrodo.

En investigaciones simultáneas, Duyne y col.<sup>3</sup> y Creighton y col.<sup>4</sup> demostraron en 1977 que la amplificación de la intensidad Raman ocurría por efecto de la superficie metálica, descartando el efecto de rugosidad. Estos resultados abrieron el camino a una nueva área de investigación denominada *Espectroscopía Raman Aumentada por Superficie* (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS).

Años después y asociado al desarrollo de la espectroscopía SERS, surgen varios investigadores que corroboran el efecto de amplificación de la señal y la hacen extensiva a otras espectroscopías. Un pionero de esta idea fue Moskovits, quien en 1985 publicó un trabajo titulado Espectroscopía Aumentada por Superficie (Surface Enhanced Spectroscopy, SES), allí desarrolla un modelo teórico en el que formula los fundamentos de los mecanismos que intervienen en el proceso de amplificación de señales espectroscópicas producidas por la presencia de nanopartículas metálicas <sup>5</sup>.

En los últimos 25 años, una línea de investigación se ha dedicado a dilucidar el efecto de las superficies metálicas rugosas en la espectroscopía de fluorescencia. Históricamente, el desarrollo de la Fluorescencia Amplificada por Superficie (Surface Enhanced Fluorescence, SEF) comienza en 1981 con los trabajos desarrollados por Glass y col.<sup>6</sup>, Ritchie y col.<sup>7</sup> y Nitzan y col.<sup>8</sup>. Estos autores observan que moléculas depositadas sobre superficies de plata tienen un importante aumento de su señal fluorescente. La magnitud del aumento en la señal de emisión ha sido comprobada, encontrándose que los factores de aumento para SEF son del orden de 100 veces, siendo inferior a los encontrados para SERS (del orden de  $10^6$  veces o más) <sup>9-11</sup>.

En este sentido y a pesar que los factores de amplificación para la espectroscopía SEF, SERS y SERRS (Surface Enhanced Resonante Raman Spectroscopy) son distintos, es posible explicar el origen de la amplificación en términos del aumento del campo electromagnético que percibe la molécula cuando es irradiada en presencia de una superficie metálica rugosa <sup>5, 12</sup>. Una explicación cualitativa de este fenómeno pueda ser expresada en los siguientes términos: la

radiación electromagnética (EM) de excitación incide sobre una superficie metálica generando la polarización de la nube electrónica de las nanopartículas presentes en esta superficie; esto da origen a un dipolo oscilante que irradia un nuevo campo EM de igual frecuencia a la radiación electromagnética de excitación y en todas las direcciones del espacio cercano a la superficie. A esta oscilación de electrones se le denomina resonancia de plasma o plasmón de superficie. Por lo tanto si una molécula en presencia de una superficie metálica es irradiada, el nuevo campo electromagnético ( $E_i$ ) generado por la superficie se suma al campo EM de excitación ( $E_0$ ) dando origen a un aumento del campo electromagnético local ( $E = E_i + E_0$ ), lo cual genera la amplificación de la señal espectral, tanto de las moléculas que estén en contacto directo con la superficie (SERS y SERRS), como de aquellas que se encuentran separadas en un amplio rango de distancia (SEF, entre 5-100 Å). Esta descripción cualitativa es conocida como **modelo electromagnético**<sup>5, 13-17</sup>.

De acuerdo con lo anterior, la distancia metal-molécula sería entonces el parámetro que determina la amplificación, ya sea en la dispersión Raman o en la emisión fluorescente, dado que la señal SERRS y SERS alcanzaría su máxima intensidad cuando la molécula se sitúa directamente sobre la nanoestructura metálica; en esta condición la fluorescencia es apagada por un eficiente proceso de transferencia de energía. Por otra parte, al separar la molécula de la superficie se disminuiría el efecto del campo electromagnético sobre la dispersión Raman, bloqueando en forma total ó parcialmente el proceso de transferencia de energía, haciendo posible observar el efecto sobre la fluorescencia<sup>5, 9, 10, 18-21</sup>. Por esta razón ha sido ampliamente estudiada la dependencia de la amplificación de la señal fluorescente con respecto a la distancia metal-molécula, existiendo hasta hoy

discrepancia respecto de cuál sería la distancia metal-molécula óptima para generar la máxima amplificación. En efecto algunos autores reportan amplificaciones de la señal fluorescente en un amplio rango de distancias, con valores que van desde 5 a 100 Å <sup>10, 18, 22-25</sup>. Sin embargo investigaciones recientemente desarrolladas por Kawasaki y col.<sup>19</sup> demuestran que la amplificación de la señal fluorescente se da entre 5 y 14 Å del metal, rango mucho más acotado y mas cerca de la superficie metálica que los hasta ahora reportados, abriendo nuevamente el debate respecto de la función que cumple la distancia molécula-metal en la intensidad amplificada de la señal fluorescente.

La presencia de la superficie metálica no solo se manifiesta a través de la amplificación de la señal de fluorescencia, si no que además se encuentran cambios en la cinética de desactivación del primer estado electrónico excitado, hecho que se verifica con la disminución del tiempo de vida del estado excitado. Este es a nuestro juicio un tema interesante, pues nos conduciría a un cambio en la forma de percibir la cinética de desactivación radiativa de una molécula en presencia de una superficie metálica. Usualmente la disminución en el tiempo de vida del estado excitado trae como consecuencia el apagamiento de la fluorescencia. En el caso de la amplificación de la fluorescencia el tiempo de vida disminuye y la emisión es aumenta <sup>10, 18, 19, 23, 26, 27</sup>.

Hoy en día uno de los desafíos que se plantean en el área de la fluorescencia amplificada por superficies es la fabricación de nuevas superficies metálicas que cuenten con espaciadores adecuados que permitan resolver el problema de la distancia metal-molécula y con ello encontrar nuevas condiciones en las cuales sea posible observar la fluorescencia amplificada por superficie. Por esta razón, el

objetivo central de este trabajo será la elaboración de una nueva superficie metálica que tenga como característica fundamental un recubrimiento, que sirva como espaciador entre los fluoróforos y la superficie metálica, ya que esto podría dar origen a un nuevo enfoque al problema de la distancia molécula-metal. Con esta idea se trabajará en la síntesis de nanopartículas de plata y la fabricación de nuevas superficies metálicas, las cuales serán usadas en estudios de fluorescencia amplificada por superficie para sistemas moleculares como Rodamina-B y derivados de la estructura trans, trans, trans-1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno.

## **CAPÍTULO 2**

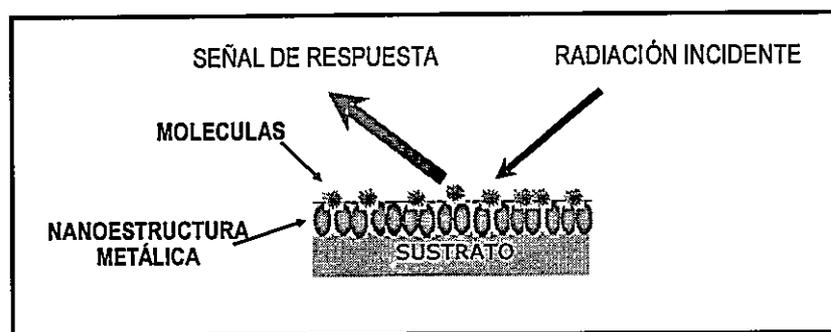
# **FUNDAMENTOS TEÓRICOS E HIPÓTESIS**

*Yo no sé si Dios existe, pero si existe, sé que no le va a molestar mi duda.*

**Mario Benedetti (1920- )** Escritor y poeta uruguayo.

## 2.1 Antecedentes Generales

En la Figura 2.1, se observa un arreglo experimental típico que permite el estudio de amplificación de señales espectrales<sup>9, 10</sup>. Sobre un sustrato (vidrio, cuarzo o mica) se deposita una película delgada compuesta por partículas metálicas de tamaño nanométrico (nanoestructura metálica) y sobre ésta una película de moléculas. Cuando este arreglo experimental se expone a la radiación electromagnética (EM) de intensidad  $I_0$ , genera un nuevo campo eléctrico ( $E_1$ ) en el entorno de las partículas metálicas. El nuevo campo electromagnético es percibido por la molécula y sumado al contenido en  $I_0$ , esto permite tener una mayor señal, tanto en fluorescencia como en dispersión Raman.



**Figura 2.1** Arreglo experimental típico para estudios de espectroscopía aumentada por superficies

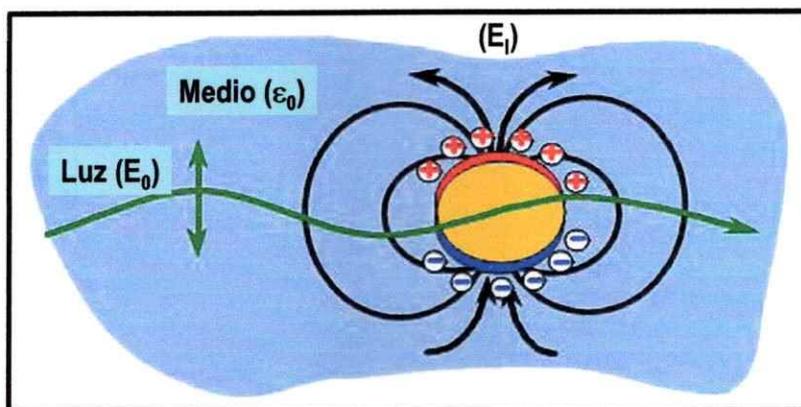
De acuerdo a lo anterior, la amplificación de la señal dependería entonces de la magnitud de campo adicional generado por el tipo de ensamble de nanopartículas (tipo de metal, forma y tamaño de la nanoestructura) en interacción con la radiación **EM** incidente. Para el caso de la fluorescencia, para poder observar una mayor intensidad en la señal, además del mayor campo electromagnético, se requiere que las moléculas se encuentren separadas de la superficie metálica.

Finalmente en este capítulo se describe las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas, cuando éstas interactúan con la radiación electromagnética (EM); luego se relacionan estas propiedades con un modelo que permita entender el efecto sobre las propiedades de la emisión fluorescente.

## 2.2 Interacción de la Radiación Electromagnética con Nanopartículas Metálicas

Una de las propiedades ópticas más relevantes de las nanopartículas es presentar niveles de energía discretos, lo que da origen a manifestación de efectos cuánticos, hecho que se aleja del comportamiento conductor de un metal y cuyos niveles de energía estarían definidos por el nivel de Fermi ( $E_F$ )<sup>18,28</sup>.

Entre estas manifestaciones de efectos cuánticos está el plasmón u oscilación de plasma, nombre que recibe la oscilación colectiva de los electrones de conducción del metal frente a un campo electromagnético (EM). La oscilación de la nube electrónica en resonancia con la frecuencia de la radiación incidente genera un nuevo campo electromagnético ( $E_i$ ), que sumado a la excitación ( $E_0$ ) da origen a la amplificación de señales espectrales. En la figura 2.2 se muestra un esquema para la excitación de una nanopartícula metálica.



**Figura 2.2** Esquema de excitación de una nanopartícula metálica y generación de la oscilación colectiva de los electrones

La descripción anterior de la interacción entre el campo EM y una nanopartícula, desde el punto de vista de la energía, no menciona el hecho que la nanopartícula experimenta una transición de sus electrones. Por ello algunos autores indican que la absorción de ( $E_0$ ) por parte de nanopartículas genera un conjunto de mecanismos por los cuales esta energía es disipada por la nanopartícula. Los distintos mecanismos de desactivación frente a un campo electromagnético pueden generar procesos radiativos y no radiativos para las nanopartículas metálicas, los cuales son denominados mecanismos de disipación <sup>25,29</sup>.

Por otra parte la caracterización de nanopartículas metálicas, tanto en solución coloidal como de nanopartículas depositadas sobre vidrio, es realizada a través de su espectro de extinción (absorción + dispersión), cuyas propiedades ópticas de absorción y dispersión fueron descritas por Mie en 1908 <sup>30,31</sup>; allí el autor propone un modelo físico que describe la probabilidad de absorción y dispersión (scattering) de la luz para nanopartículas metálicas a través de la denominada sección eficaz geométrica de extinción <sup>15,32</sup>.

## 2.2.1 Modelo electromagnético para esfera

En la literatura es posible encontrar modelos que permiten calcular de forma aproximada la magnitud del nuevo campo electromagnético generado por la interacción de la luz con las nanopartículas metálicas de diferentes formas geométricas y tamaños<sup>9, 15, 16, 33</sup>, donde se considera que las dimensiones (dm) de las nanopartículas son mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente ( $dm \ll \lambda_{exc}$ ). Bajo estas circunstancias, el campo electromagnético incidente puede ser considerado constante en el espacio en que se encuentra la nanopartícula metálica, acción que permite describir el fenómeno en términos de la electrostática en vez de la electrodinámica. A esta último se le denomina aproximación cuasiestática<sup>15, 16</sup>.

El *modelo para esferas metálicas*, utilizando las aproximaciones anteriores, es el mas simple hasta ahora reportado en la literatura<sup>34, 35</sup> y considera una partícula esférica de radio ( $a$ ) mucho menor a la longitud de onda de excitación ( $a \ll \lambda_{exc}$ ).

Si denotamos como  $E_0$ , al módulo del vector campo eléctrico de la radiación incidente, el nuevo campo eléctrico  $E_I$  que rodea a la partícula esférica, se obtendrá resolviendo la ecuación de Laplace  $\nabla^2 \varphi = 0$ , donde  $\varphi$  es el potencial eléctrico, y el valor de  $E_I$  se obtiene a través del gradiente del potencial, es decir  $E = -\nabla \varphi$ . Con esto se determina el campo eléctrico de una esfera metálica de radio  $a$ , ecuación que se describe como:

$$E_I(\omega) = \frac{\epsilon_m(\omega) - \epsilon_0}{\epsilon_m(\omega) + 2\epsilon_0} \cdot \frac{a^3}{r^3} E_0(\omega) + E_0(\omega) \quad (2.1)$$

donde  $\epsilon_m(\omega)$  y  $\epsilon_0$ , corresponden a la función dieléctrica del metal y la constante dieléctrica del medio respectivamente. El primer término del campo eléctrico local es similar al campo eléctrico generado por un dipolo  $\mathbf{p}$ ,  $p(\omega) = \frac{\epsilon_m(\omega) - \epsilon_0}{\epsilon_m(\omega) + 2\epsilon_0} \cdot a^3 E_0(\omega)$ , finalmente el campo eléctrico local que percibe una molécula ubicada en el vacío ( $\epsilon_0 = 1$ ) a una distancia  $d$  de la partícula metálica de radio  $a$  queda determinada por la ecuación 2.2

$$E_l(\omega) = g_0 \frac{a^3}{(a+d)^3} E_0(\omega) + E_0(\omega) \quad (2.2)$$

en la cual se ha introducido el factor  $g_0 = [\epsilon_m(\omega) - 1] / (\epsilon_m(\omega) + 2)$ . Estas ecuaciones nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- a) Se obtendrá un mayor campo eléctrico cuando la función dieléctrica del metal sea igual a  $\epsilon_m(\omega) = -2$ , cumpliendo así la condición de resonancia.
- b) El campo electromagnético tendrá su máximo valor cuando la parte imaginaria de  $\epsilon(\omega)$  es pequeña<sup>9</sup>.

Así este nuevo campo EM es el que dará origen al aumento en señal espectral, no sólo de moléculas que se encuentran sobre la superficie metálica, sino que también dentro de un amplio rango de distancia entre el metal y la molécula<sup>9,16</sup>.

Por otra parte, para otras formas geométricas, distinta de la esférica, los trabajos publicados hasta ahora se han hecho en función de las necesidades de los autores, quienes han descrito algunos modelos para geometrías elipsoides, triángulos y semiesferas<sup>15,33,36</sup>.

Pero el término descrito en la ecuación anterior ( $E_r(\omega)$ ), no se relaciona directamente con la intensidad de campo EM producida en la superficie de la esfera metálica frente a un campo EM externo de frecuencia ( $\omega_{ext}$ ), ya que normalmente las fuentes de radiación como un lámpara se miden en  $W/m^2$  (Intensidad ( $I$ )); por esta razón es necesario encontrar una relación entre el campo EM y la intensidad.

La relación entre el campo EM y la intensidad es descrita a través del vector de Poynting ( $S$ )<sup>37</sup> que define, para cualquier onda electromagnética, la energía de radiación partido per unidad de área o **densidad de energía ( $u$ )**.

### 2.2.1.1 Vector de Poynting

Si suponemos que el campo eléctrico en si mismo puede almacenar energía de alguna forma, que este campo eléctrico es continuo y por tanto su energía es continua, permitiendo calcular la densidad de energía ( $u_E$ ) del campo eléctrico  $E$  como si este fuera el campo eléctrico entre las placas de un condensador.

$$u_E = \frac{\epsilon_0}{2} E^2 \quad (2.3)$$

De manera análoga, la densidad de energía para la componente magnética ( $u_B$ ) se define como:

$$u_B = \frac{1}{2\mu_0} B^2 \quad (2.4)$$

La relación  $E = cB$ , donde  $c$  es la velocidad de la luz, se deriva específicamente para ondas planas; sin embargo, su aplicabilidad es general.

Utilizando  $c = \sqrt{\epsilon_0 \mu_0}$  se deduce que

$$u_B = u_E \quad (2.5)$$

De lo anterior se concluye que la energía que fluye en el espacio en forma de onda electromagnética es compartida, por igual, por los campos constituyentes, eléctricos y magnéticos. Puesto que

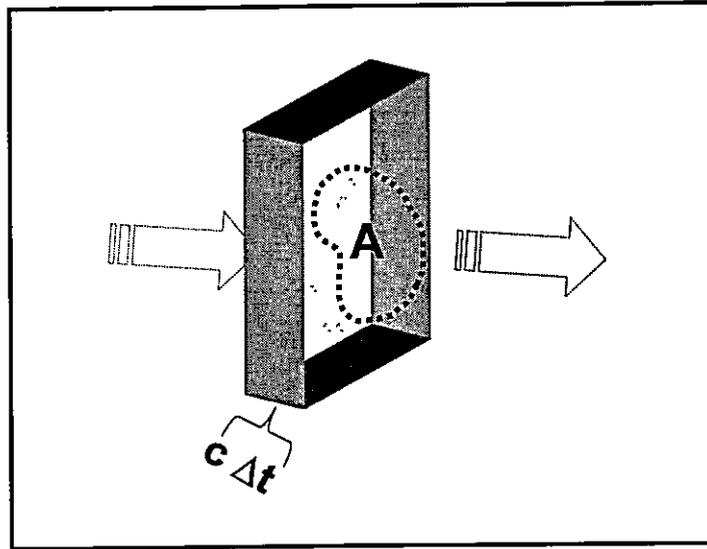
$$u = u_E + u_B \quad (2.6)$$

$$u = \epsilon_0 E^2 \quad (2.7)$$

o de manera equivalente,

$$u = \frac{1}{\mu_0} B^2 \quad (2.8)$$

Para determinar el flujo de energía electromagnética asociada a una onda que viaja por un espacio y medio determinado, suponemos que  $S$  representa el transporte de energía per unidad de tiempo (potencia) en un área dada. En el sistema SI,  $S$  tiene unidades de  $W/m^2$ . En la figura 2.3 se ilustra una onda electromagnética que viaja con velocidad  $c$  a través de un área  $A$ .



**Figura 2.3** Flujo de energía electromagnética

Durante un intervalo  $\Delta t$  muy pequeño, tan solo la energía contenida en el volumen cilíndrico,  $u(c\Delta tA)$ , cruzará A. Por lo tanto

$$S = \frac{uc\Delta tA}{\Delta tA} = uc \quad (2.9)$$

o utilizando la ecuación 2.7

$$\vec{S} = \frac{1}{\mu_0} EB \quad (2.10)$$

Donde  $\vec{S}$  es el llamado vector de pointing.

Si la energía fluye en la dirección de propagación de la onda, entonces el vector  $\vec{S}$  correspondiente es,

$$\vec{S} = \frac{1}{\mu_0} \vec{E} \times \vec{B} \quad (2.11)$$

o

$$\vec{S} = c^2 \epsilon_0 \vec{E} \times \vec{B} \quad (2.12)$$

La magnitud de  $S$  es la potencia partido por unidad de área que cruza una superficie cuya normal es paralela a  $S$ .

Aplicamos entonces estas consideraciones a un onda plana armónica, linealmente polarizada (las direcciones de los campos  $E$  y  $B$  son fijas), que viaja a través del espacio libre en dirección  $k$ .

$$E = E_0 \cos(kr - \omega t) \quad (2.13)$$

$$B = B_0 \cos(kr - \omega t) \quad (2.14)$$

utilizando la ecuación 2.12 encontramos que

$$S = c^2 \epsilon_0 E_0 \times B_0 \cos^2(kr - \omega t) \quad (2.15)$$

Este es el flujo de energía partido por unidad de área y unidad de tiempo.

Finalmente la intensidad de luz y su relación con el campo EM se obtiene del término irradiancia que se define como el valor medio en un intervalo de tiempo ( $T \gg \tau$ ) de la magnitud asociada al vector de Poynting  $\langle S \rangle_\tau$ .

$$\langle S \rangle_\tau = c^2 \epsilon_0 \left| \vec{E}_0 \times \vec{B}_0 \right| \cos^2(kr - \omega t) \quad (2.16)$$

suponiendo que  $\langle \cos^2(kr - \omega t) \rangle = \frac{1}{2}$  para  $T \gg \tau$

$$\langle S \rangle_\tau = \frac{c^2 \epsilon_0}{2} \left| \vec{E}_0 \times \vec{B}_0 \right| \quad (2.17)$$

y dejando todo en función de  $E_0$ , con la relación  $E_0 = cB_0$  definimos finalmente a  $\langle S \rangle$  como

$$S = c \epsilon_0 \frac{E_0^2}{2} \quad (2.18)$$

donde  $c$  es la velocidad de la luz,  $\epsilon_0$  la permitividad del medio y  $E_0^2$  es la magnitud de campo electromagnético de frecuencia ( $\omega$ ). Si a la ecuación (2.3) la dividimos por una unidad de área, es posible establecer que la intensidad media ( $I$ ) de la radiación sobre un área es proporcional a  $E_0^2$ .

$$S = C \frac{E_0^2}{A^2} \propto I \quad (2.19)$$

donde  $C$  es una constante ( $C=c\epsilon_0/2$ ),  $E_0^2$  es la magnitud de campo electromagnético de frecuencia ( $\omega$ ),  $A^2$  área de paso de los fotones e  $I$  es la intensidad de radiación.

## 2.2.2 Propiedades ópticas para nanopartículas

La propiedad óptica de absorción y dispersión para nanopartículas metálicas fue descrita por Mie en 1908<sup>30, 31</sup>. Desde el punto de vista físico, este modelo describe la probabilidad de las nanopartículas de absorber y dispersar la luz (scattering). Esta relación entre absorción y dispersión se introduce definiendo el índice de refracción de un material como un número complejo ( $n - ik$ ). Ambos  $n$  y  $k$  son característicos del material y dependen de la longitud de onda;  $k$  aumenta con la longitud de onda cuando se aproxima a un pico de absorción. Para materiales no absorbentes,  $k=0$ .

Si suponemos que un haz de luz atraviesa una capa en el plano  $yz$  de un material cualquiera de grosor  $\Delta x$ , y situada en el vacío ( $n=1$ ), entonces el campo eléctrico transmitido a través de la capa estará dado por la ecuación:

$$E_{n=1} = E_0 \cos \left[ 2\pi \left( \nu t - \frac{x}{\lambda} \right) \right] \quad (2.20)$$

Además si suponemos que la capa de grosor  $\Delta x$  está compuesta por un material con un índice de refracción  $n$ , la luz tomará más tiempo  $\Delta t$ , en pasar a través de la capa debido al efecto de retraso del medio. En este caso el campo emergente debería estar dado por

$$E_n = E_0 \cos \left[ 2\pi \left( \nu(t + \Delta t) - \frac{x}{\lambda} \right) \right] \quad (2.21)$$

el retardo puede ser asociado con el grosor de la capa ( $\Delta x$ ) y el índice de refracción ( $n$ ) de la siguiente forma:

$$\Delta t = t_n - t_{n-1} = \frac{\Delta x}{\frac{c}{n}} - \frac{\Delta x}{c} = (n-1) \frac{\Delta x}{c} \quad (2.22)$$

donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío. Esto quiere decir que podemos reescribir la ecuación 2.21 a:

$$E_n = E_0 \cos \left[ 2\pi \left( vt + (n-1) \frac{\Delta x}{\lambda} - \frac{x}{\lambda} \right) \right] \quad (2.23)$$

la ecuación 2.23 evidencia el cambio de fase del campo EM cuando atraviesa un medio.

A partir de la relación descrita en la ecuación (2.24) la función trigonométrica coseno está dada por la parte real de la función  $e^{i\theta}$ , donde  $\theta = 2\pi v$

$$e^{i\theta} = \cos \theta + i \sin \theta \quad (2.24)$$

Esto significa que las ecuaciones 2.21 y 2.23 pueden relacionarse entre sí y ser escritas como:

$$E_{n=1} = E_0 \exp \left[ 2\pi i \left( vt - \frac{x}{\lambda} \right) \right] \quad (2.25)$$

y

$$E_n = E_0 \exp \left[ 2\pi i \left( \nu t + (n-1) \frac{\Delta x}{\lambda} - \frac{x}{\lambda} \right) \right] \quad (2.26)$$

Si se considera sólo la parte real del número complejo de la ecuación, 2.26 queda como:

$$E_n = E_0 \exp \left[ 2\pi i \left( \nu t - \frac{x}{\lambda} \right) \right] \exp \left[ 2\pi i (n-1) \frac{\Delta x}{\lambda} \right] \quad (2.27)$$

$$E_n = E_{n=1} \exp \left[ 2\pi i (n-1) \frac{\Delta x}{\lambda} \right] \quad (2.28)$$

Por otra parte, la intensidad de la luz es proporcional al cuadrado de la amplitud de campo electromagnético<sup>37</sup>, por lo tanto

$$\frac{I_n}{I_{n=1}} = \exp \left[ 4\pi i (n-1) \frac{\Delta x}{\lambda} \right] \quad (2.29)$$

Consideremos el caso en que el índice de refracción es un número complejo; la ecuación 2.29 se reescribe como:

$$\frac{I_n}{I_{n=1}} = \exp \left[ 4\pi i (n + ik - 1) \frac{\Delta x}{\lambda} \right] = \exp 4\pi i (n-1) \frac{\Delta x}{\lambda} \exp \left( -4\pi k \frac{\Delta x}{\lambda} \right) \quad (2.30)$$

El primer término de la ecuación 2.30 es exactamente la razón  $I_n/I_{n-1}$  para un material no absorbente, mientras que el segundo término que se describe como  $\exp(-4\pi k \frac{\Delta x}{\lambda})$ , contiene la parte imaginaria del índice de refracción.

### 2.2.2.1 El formalismo de Beer-Lambert

En la ecuación de Beer-Lambert, la intensidad de la luz transmitida  $I_t$  con respecto a la intensidad de la luz incidente  $I_0$  está dada por

$$\frac{I_t}{I_0} = \exp(-\varepsilon_{abs}\Delta x) \quad (2.31)$$

donde  $\varepsilon_{abs}$  es la absorbancia del material. La comparación de la ecuación 2.30 y 2.31 muestra que ambas describen la atenuación de la luz debido a la absorción en términos de una exponencial negativa que es proporcional a la longitud de paso óptico a través del material absorbente. Puesto que las dos expresiones describen el fenómeno en la misma forma funcional, los factores de proporcionalidad también deberían ser iguales. Por lo tanto, la parte imaginaria del índice de refracción complejo y la absorbancia del material deberían estar relacionadas de la siguiente manera:

$$\varepsilon_{abs} = 4\pi k / \lambda \quad (2.32)$$

Para sistemas absorbentes la turbidez es un concepto análogo a la absorción, por ello se puede escribir;

$$\left(\frac{I_t}{I_0}\right)_{sca} = \exp(-\tau\Delta x) \quad (2.33)$$

donde el subíndice (*sca*) significa scattering. Las ecuaciones 2.32 y 2.33 son complementarias, ya que la primera describe la absorción sin scattering y la segunda describe el scattering sin absorción. Para un sistema que presenta ambos efectos ópticos, que es el caso de las nanopartículas metálicas, la relación está compuesta por;

$$\left(\frac{I_t}{I_0}\right) = \exp(-(\varepsilon_{abs} + \tau)\Delta x) \quad (2.34)$$

Por lo tanto el espectro de extinción experimental de una solución coloidal o una superficie metálica se presenta como la suma de dos componentes la absorción ( $\varepsilon_{abs}$ ) y la dispersión de la luz ( $\tau$ ).

### 2.2.2.2 Sección geométrica de absorción y dispersión

La literatura que considera la relación entre absorción y dispersión describe los factores de absorción y turbidez como un producto de numerosos términos. La nomenclatura y notación usadas en esta área varía de autor en autor <sup>30, 38</sup>; sin embargo en términos generales  $\epsilon_{abs}$  y  $\tau$  puede ser descritos como:

$$\epsilon_{abs} = C_N \pi R_s^2 \chi_{abs} \quad (2.35)$$

$$\epsilon_{sca} = C_N \pi R_s^2 \chi_{sca} \quad (2.36)$$

$C_N$  es la concentración de la partícula (en términos de número de partículas dispersas en un volumen),  $R_s$  es el radio de la partícula y  $\chi$  es conocido como factor de eficiencia para scattering y absorción. La cantidad  $\pi R_s^2$  en estas ecuaciones entrega la sección geométrica de las esferas. Esta área y el factor de eficiencia definen una cantidad conocida como sección geométrica  $C_{abs}$  y  $C_{sca}$  para absorción y scattering, respectivamente:

$$C_{abs} = \pi R_s^2 \chi_{abs} \quad (2.37)$$

$$C_{sca} = \pi R_s^2 \chi_{sca} \quad (2.38)$$

Los valores de  $\varepsilon_{\text{abs}}$  y  $\tau$  describen la atenuación de la luz por unidad de paso óptico y tienen unidades de longitud de onda. Las magnitudes  $C_{\text{abs}}$  y  $C_{\text{sca}}$  están asociadas a diferentes formas y tamaños de nanopartículas.

### 2.2.3 Mecanismos de disipación de energía para nanopartículas metálicas

Un vez que la nanopartícula ha interactuado con un campo electromagnético ésta tiene distintos mecanismo que permiten disipar la energía adquirida; a esto se le denomina en literatura como mecanismo de *damping* o mecanismo de disipación. Trabajos desarrollado por Drexhage<sup>39, 40</sup>, en los inicios de los años 70 y la teoría semiclásica desarrollada por Gersten y Nitzan<sup>8</sup> permiten describir una relación entre los mecanismos de desactivación radiativos y no radiativos para nanopartículas metálicas, de acuerdo a la siguiente relación.

$$\Gamma_r \leq \frac{4\pi^2 V}{3\lambda^3} \frac{1}{\text{Im}(\varepsilon - 1)^{-1}} \Gamma_{nr} \quad (2.39)$$

donde  $\Gamma_r$  y  $\Gamma_{nr}$  corresponden a las constantes de velocidad de decaimiento radiativo y no radiativo respectivamente,  $V$  volumen de la nanopartícula,  $\lambda$  longitud de onda de excitación e  $\text{Im}$  parte imaginaria de la constante dieléctrica del metal  $\varepsilon$ .

Para el caso de nanopartículas de plata la ecuación 2.39 anterior puede ser simplificada:

$$\Gamma_r \leq \frac{4\pi^2 V}{3\lambda^3} \frac{1}{\text{Im}(\varepsilon - 1)^{-1}} \Gamma_{nr} \approx 600 \frac{V}{\lambda^3} \Gamma_{nr} \quad (2.40)$$

Con esta función es posible establecer una relación intrínseca entre los canales de desactivación radiativos y no radiativos para diferentes formas geométricas de nanopartículas a través del volumen ( $V$ ).

De acuerdo a lo anterior y haciendo un paralelo con la teoría de Mie (Sección 2.2.2), tenemos que la luz de excitación al interactuar con una nanopartícula metálica genera la dispersión o absorción de esa luz. Esto provoca distintos procesos en la nanopartículas que pueden ser interpretados como procesos radiativos producto de la dispersión ocurrida en la zona de incidencia de la luz de excitación, así como procesos no radiativos causados por la absorción de la luz. En base a los antecedentes antes mencionados, algunos autores han explicado las propiedades ópticas de las nanopartículas relacionando tanto la teoría de Mie como la de disipación de energía por parte de las nanopartículas (*damping*), donde la sección geométrica de absorción y dispersión, se relacionan con los procesos de desactivación no radiativos y radiativos para las nanopartículas metálicas<sup>28, 41, 42</sup>.

$$\Gamma_{total} \leftrightarrow C_{ext} \quad \Gamma_r \leftrightarrow C_{sca} \quad \Gamma_{nr} \leftrightarrow C_{abs} \quad (2.41)$$

donde  $C_{ext}$ ,  $C_{sca}$  y  $C_{abs}$  corresponden a las secciones eficaces de extinción, dispersión y absorción respectivamente, además  $\Gamma_{total}$ ,  $\Gamma_r$ ,  $\Gamma_{nr}$  corresponden a las constantes de desactivación total, radiativa y no radiativa.

## 2.2.4 Fabricación de sustratos metálicos

Dado que la intensidad del campo EM generado por una superficie metálica depende fuertemente de la forma y el tamaño de las nanopartículas, un área que suscita interés en la actualidad, es la obtención de nuevas superficies que puedan ser utilizadas en estudios de amplificación de señales espectrales <sup>9</sup>.

Los sustratos comúnmente utilizados para estudios de fluorescencia amplificada por superficie son las películas delgadas de plata evaporadas al vacío <sup>21, 43-46</sup>; no obstante la reciente utilización de vidrios funcionalizados para fijar partículas de coloides metálicos <sup>47</sup>, permite ampliar el espectro de posibilidades.

## 2.3 Interacción entre el Campo Electromagnético, Superficie Metálica y Moléculas

Para entender el fenómeno de amplificación de la señal espectral no basta solo con explicar lo que ocurre con la nanoestructura metálica a través del *modelo electromagnético*, sino que es necesario además describir el efecto que percibe la molécula cuando esta se encuentra cercana a una superficie metálica. En este sentido el efecto de amplificación de la señal fluorescente comprende dos procesos que dependen de la distancia metal-molécula. El primero tiene que ver con el aumento del campo electromagnético percibido por la molécula y el segundo en cambio tiene relación con la transferencia de energía no radiativa desde la molécula hacia la superficie nanoestructurada, donde ambos procesos compiten entre sí<sup>48,49</sup>.

Ambos procesos se grafica en la figura 2.4, donde el campo electromagnético generado por una esfera metálica desde su superficie, puede ser descrito por el modelo por la ecuación 2,27 que fue descrita en la sección 2.2.1 ( $E_l(\omega_{ext})$ ).

$$\frac{E_l^2}{E_0^2} \approx \left( \frac{a^3}{(a+d)^3} \right)^2 + 1 \quad (2.27)$$

donde  $E_l$  es el campo electromagnético amplificado por la nanopartícula,  $E_0$  es el campo electromagnético de la fuente de excitación,  $d$  es la distancia de propagación de campo EM desde la superficie de la esfera y  $a$  es el radio de la esfera metálica, que para este caso es de 15 nm. La intensidad de campo EM amplificado esta

definido por  $(E_1^2/E_0^2)$  en función de la distancia se describe con la línea discontinua.

Por otra lado el apagamiento de la fluorescencia es proporcional a el inverso de la distancia al cubo ( $1/d^3$ ) y se grafica con línea negra continua.

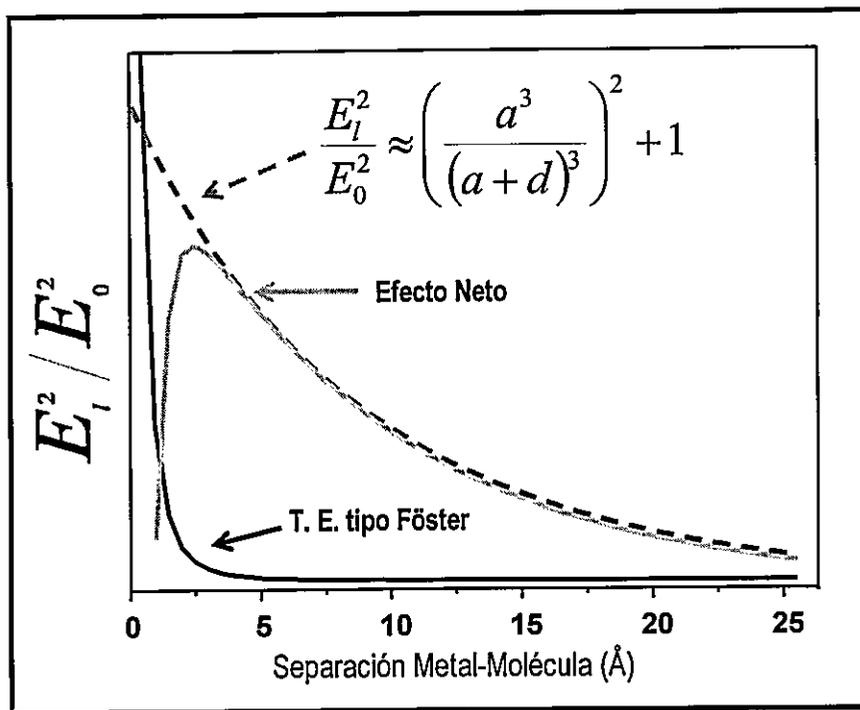


Figura 2.4 Modelo que describe el efecto de la distancia metal-molécula

Si analizamos la figura 2.4 podemos inferir que moléculas cercanas a la superficie presentan apagamiento de la emisión debido a la transferencia de energía, por lo tanto en esta condición prima el efecto de amplificación sobre la dispersión, dando origen a las espectroscopias Raman resonante aumentado por superficie (SERRS) o Raman amplificado por superficie (SERS).

Por otro lado, si la molécula se aleja de la superficie a una distancia superior a 3 Å, la transferencia de energía disminuye y debido a que el campo electromagnético disminuye más lentamente la molécula podría percibir su efecto. En este caso si sumamos las curvas de campo EM y apagamiento, se obtiene la línea de color verde que indicaría una distancia óptima donde la transferencia de energía es menor y el campo electromagnético todavía es importante y es en esta condición donde es posible observar fluorescencia amplificada por superficie (SEF).

En la literatura la competencia entre la amplificación de la señal fluorescente y el apagamiento de la emisión, es aprovechado por algunos autores para realizar estudios de espectroscopía Raman y Raman resonante de moléculas de alta fluorescencia como la Rodamina-B, donde recomiendan depositar directamente la molécula sobre una superficie metálica para apagar la fluorescencia; esto permitiría observar el espectro Raman amplificado por la superficie (SERS) y Raman resonante amplificado por superficie (SERRS) <sup>50-53</sup>. Entonces los estudios SEF requieren de superficies metálicas más elaboradas, que cuenten con espaciadores que permitan separar la molécula de la superficie metálica, evitando así la inhibición del efecto.

Además, si observamos la figura 2.4 es posible notar que el aumento del campo electromagnético se da en un amplio rango de distancias; sin embargo, el campo EM amplificado disminuye al alejarse de la superficie; por lo tanto, no se asegura que a mayor distancia de la superficie se obtenga mayor amplificación del campo electromagnético y por consiguiente de la fluorescencia. Basado en este modelo algunos autores proponen que la distancia metal-molécula no debe ser superior a 3 ó 4 (Å) <sup>19,22</sup>.

### 2.3.1 Espaciadores para el control de la distancia

Los espaciadores son películas delgadas constituidas principalmente por ácidos grasos, óxido de silicio  $\text{SiO}_2$  y polímeros que cubren la superficie metálica permitiendo la separación entre la molécula y la nanoestructura.

La condición que deben cumplir estos espaciadores es que sean inertes tanto en forma química, como en sus propiedades ópticas <sup>7, 24, 54</sup>.

Los primeros trabajos que reportan fluorescencia amplificada por superficie metálica utilizando espaciadores se remontan a los años 80. Glass y col <sup>6</sup> usaron un polímero transparente (polipropileno) lo que permitió controlar la distancia y reducir el efecto de decaimiento no radiativo por efecto del metal. El uso de películas delgadas de  $\text{SiO}_2$  también ha sido reportado por algunos autores como, Wokaun y col <sup>25</sup> y Tarcha y col <sup>22</sup>.

Por otra parte, los resultados más evidentes fueron obtenidos con películas delgadas construidas con la técnica de Langmuir-Blodgett (LB) <sup>9</sup>, con la cual es posible generar películas ordenadas tanto de espaciadores (ácidos grasos) como de moléculas. En la figura 2.5 se muestra la estructura general que tiene este tipo de arreglo experimental.

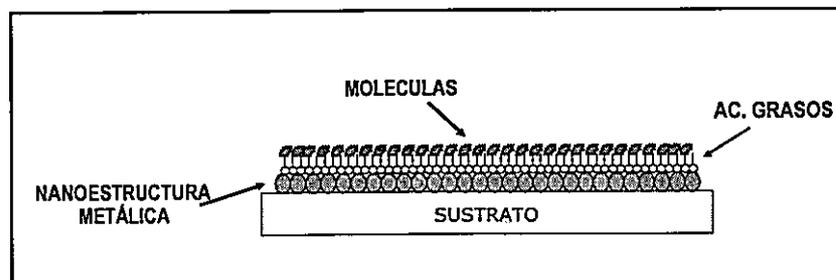


Figura 2.5 Arreglo experimental molécula-metal con espaciador

La técnica LB fue ampliamente utilizada en diversos estudios de SERS y SERRS; así lo muestran algunas publicaciones de PGJ Goulet y col.<sup>20</sup>, CJ L Constantino y col.<sup>55</sup>, entre otras. Además el uso de esta técnica ha permitido el desarrollo de estudios en SEF. En trabajos realizados por R. Aroca y col.<sup>44</sup> y Z. Zhang y col.<sup>56</sup>, se preparan muestras con distintas capas de ácido grasos lo que permite controlar la distancia molécula-metal y observar en la amplificación de la fluorescencia en función de la separación metal-molécula.

Otra forma de construir superficies para estudios de amplificación en fluorescencia es el uso de nanopartículas metálicas recubiertas con monocapa protectora. Estos sustratos se construyen preparando coloides con sustancias orgánicas que estabilizan las partículas en solución; luego estas nanopartículas son fijadas sobre un vidrio funcionalizado para ser utilizados en estudios de amplificación. Entre los trabajos mas destacados en esta área está la reciente publicación de Rotello y col.<sup>57</sup>, quienes funcionalizan nanopartículas metálicas con macromoléculas biológicas para producir bio-materiales.

## 2.4 Cinética de Desactivación de un Fluoróforo en Presencia de Nanoestructura Metálica

Para el caso particular de SEF, el efecto de superficies metálicas nanoestructuras se manifiesta en la amplificación de la intensidad de emisión molecular así como en un conjunto de cambios en la cinética de desactivación del primer estado electrónico excitado, siendo el más notable, la disminución del tiempo de vida del estado excitado. Esto sería a nuestro juicio un aspecto relevante pues nos conduce a un cambio en la forma de percibir el problema de la cinética de desactivación de un fluoróforo. En efecto, usualmente la disminución del tiempo de vida del estado excitado trae como consecuencia el apagamiento de la fluorescencia; sin embargo lo que ocurre entre la nanopartículas metálicas y las moléculas es diferente, ya que allí la disminución en el tiempo de vida viene asociado con un importante realce en la señal fluorescente.

En la Figura 2.6, se señalan los principales procesos de desactivación del primer estado excitado de un fluoróforo. En ausencia de superficie metálica, la velocidad del proceso de absorción está representada por  $E$ . Una vez que la molécula se encuentra en el estado excitado se producen los procesos de desactivación radiativos  $\Gamma$  y no radiativos  $k_{nr}$ . El rendimiento cuántico de emisión ( $Q_o$ ), descrito como el número de fotones emitidos dividido por el número de fotones absorbidos, se expresa en términos de las constantes de velocidad  $\Gamma$  y  $k_{nr}$  mediante la ecuación y el tiempo de vida (fluorescente)  $\tau_0$ , que corresponde al inverso de todas las constantes de desactivación.

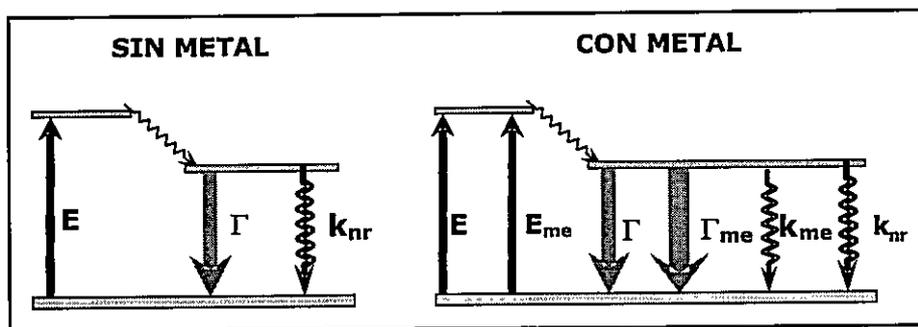
$$Q_0 = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.28)$$

$$\tau_0 = (\Gamma + k_{nr})^{-1} \quad (2.29)$$

En presencia de una superficie metálica nanoestructurada (**me**) aparecen nuevos procesos de desactivación, caracterizado por  $\Gamma_{me}$  y  $k_{me}$ . La constante de desactivación ( $k_{me}$ ) puede ser omitida si el fluoróforo se sitúa a una distancia adecuada donde no experimente apagamiento por la nanoestructura. En esta situación la velocidad de decaimiento radiativo  $\Gamma$ , es aumentada por la adición de un nuevo factor  $\Gamma_{me}$ , (Figura 2.6). Finalmente, el rendimiento cuántico y el tiempo de vida del fluoróforo en presencia de la superficie metálica están dados por las ecuaciones 2.30 y 2.31.

$$Q_{me} = \frac{\Gamma + \Gamma_{me}}{\Gamma + \Gamma_{me} + k_{nr}} \quad (2.30)$$

$$\tau_{me} = (\Gamma + \Gamma_{me} + k_{nr})^{-1} \quad (2.31)$$



**Figura 2.6** Procesos cinéticos de desactivación del estado excitado de un fluoróforo

donde los símbolos en la figura 2.6 corresponden a:  $E$  es la probabilidad de absorción,  $E_{me}$  la probabilidad de absorción aumentada por el metal,  $\Gamma$  decaimiento radiativo,  $\Gamma_{me}$  decaimiento radiativo por efecto del metal,  $k_{nr}$  decaimiento no radiativo de la molécula y  $k_{nr(me)}$  decaimiento no radiativo de la molécula debido al metal.

Debemos hacer notar que en la mayoría de las aplicaciones clásicas de la espectroscopía de fluorescencia, las propiedades espectrales del fluoróforo son alteradas por la modificación de las constantes de velocidad de los procesos no radiativos. Tanto el apagamiento colisional como la transferencia de energía proporcionan vías de desactivación hacia el estado fundamental, manifestadas por la disminución tanto en la emisión como en el tiempo de vida radiativo del fluoróforo. En cambio, si la molécula se encuentra interactuando con una superficie metálica, ocurre un proceso de transferencia de energía, lo que explicaría una disminución del tiempo de vida, pero no así el aumento de la emisión de este sistema molecular<sup>10,27</sup>.

## 2.5 Factor de Amplificación (FA)

El aumento en la intensidad de la señal de un fluoróforo ubicado a la distancia  $d$  de una estructura metálica puede ser determinado a partir del nuevo campo eléctrico que percibe la molécula. El Factor de Amplificación (FA) de la señal fluorescente en un experimento SEF, descrito por el término  $FA(\omega_{ex}, \omega_{em})$ , corresponde a la razón de la intensidad de fluorescencia del sistema molecular medida en presencia de una superficie metálica, relativa a la intensidad de fluorescencia de la misma muestra en una superficie sin metal e irradiada con igual intensidad. El FA, también denominado por algunos autores como **Rendimiento cuántico aparente**<sup>10, 23, 27</sup>, se expresa a través de la ecuación 2.32,

$$FA(\omega_{ex}, \omega_{em}) = |L(\omega_{ex})|^2 |Z(\omega_{em})| \quad (2.32)$$

donde  $\omega_{ex}$ , y  $\omega_{em}$ , corresponden a las frecuencias de excitación y emisión, respectivamente. Esta ecuación muestra que la magnitud del aumento de la señal depende de:

a) El término  $|L(\omega_{ex})|^2$  corresponde a la intensidad del campo eléctrico amplificado por la superficie nanoestructurada, en el sitio donde se encuentra la molécula y representa la capacidad del metal de concentrar la energía electromagnética cuando la longitud de onda de excitación coincide con la resonancia del plasmón de superficie del metal. Por lo tanto, este factor depende de la naturaleza de la superficie

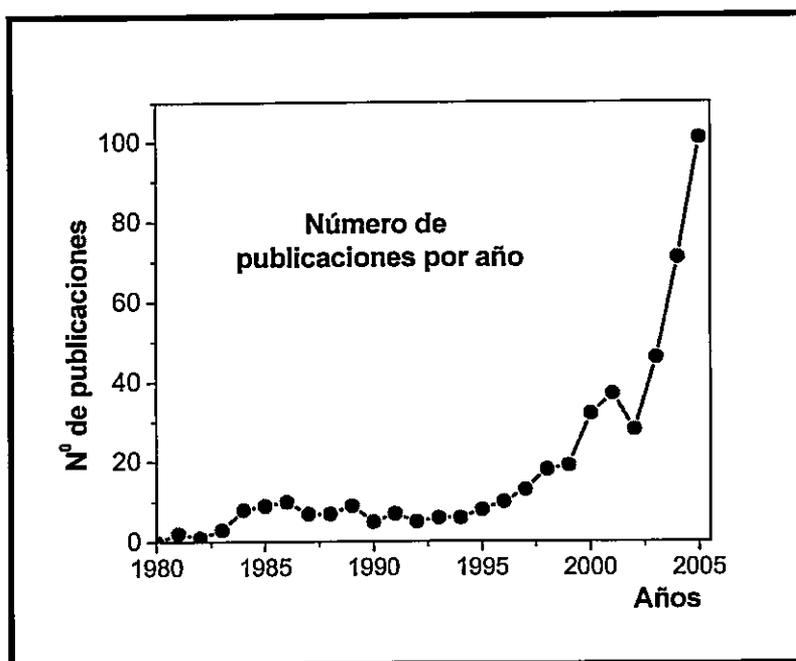
metálica. Lo anterior se describe en una publicación reciente de Le Ru y col.<sup>13</sup> así como en publicaciones anteriores de Kahl y col.<sup>58</sup> y Schatz y col.<sup>33</sup>.

b) La magnitud del segundo término  $|Z(\omega_{em})|$  es proporcional a  $1/Q_0$ , donde  $Q_0$  es el rendimiento cuántico de emisión de la molécula; así moléculas de un alto rendimiento cuántico no producirán altos valores de amplificación de la fluorescencia. Los factores contenidos en este término están relacionados con los procesos de desactivación radiativos y no radiativos de la molécula, que debido a la interacción con la superficie metálica tienen una fuerte dependencia de la distancia metal-molécula. Esto es comprobado experimentalmente observando el tiempo de vida del estado excitado, ya que este parámetro decrece rápidamente con el acercamiento del fluoróforo a la superficie metálica, provocando su apagamiento. Esto se debe a un eficiente proceso de transferencia de energía tipo Förster no radiativo de la molécula hacia la superficie metálica el cual decrece rápidamente con  $d^{-3}$  ( $d$  separación metal-molécula) y compite con la amplificación del campo eléctrico local. La competencia entre la amplificación de la señal y el apagamiento fue descrita con detalle en la sección 2.3.

La modificación del campo electromagnético amplificado por la superficie y el efecto de ésta en la cinética de desactivación del estado excitado son los factores que determinan la amplificación de la fluorescencia, teniendo claridad al respecto es ahora necesario indagar en las interrogantes que actualmente presenta el área de la Fluorescencia Amplificada por Superficie (SEF) para luego plantear las hipótesis y objetivos correspondientes.

## 2.6 Revisión Bibliográfica

Si realizamos un análisis histórico desde los inicios en los años 80 en el campo de la espectroscopía de fluorescencia amplificada por superficie, podemos observar un aumento sostenido en el número de publicaciones de esta área.



**Figura 2.7** Publicaciones en el área de la espectroscopía amplificada por superficies

Entre los artículos más destacados en los últimos 25 años podemos mencionar el trabajo de Garoff y col. (1984)<sup>59</sup>, donde se publicó la importante disminución en el tiempo de vida de sistemas moleculares depositados sobre películas metálicas.

En 1985, Moskovits<sup>5</sup>, presenta su trabajo titulado “Surface Enhanced Spectroscopy”, en el cual entrega los fundamentos y mecanismos de la adsorción química; además desarrolló un modelo electromagnético que explicaría

simultáneamente la espectroscopía SERS y SEF. Además Gersten y col.<sup>60</sup> entregan los fundamentos teóricos que describen el proceso de transferencia de energía en presencia de superficies metálicas.

Por otra parte Aroca y col., en dos artículos en 1990 y 1997<sup>44, 61</sup>, realizaron estudios en espectroscopia SEF, utilizando ácidos grasos depositados mediante técnicas Langmuir-Blodgett para separar el fluoróforo del metal. Un año después Sokolov y col.<sup>23</sup>, preparan superficies metálicas depositando soluciones coloidales para realizar un estudio de la amplificación de la señal fluorescente en función de la distancia metal-fluoróforo; emplearon separadores tipo orgánicos depositados a través de técnicas de Langmuir-Blodgett.

Un año después, los trabajos mas destacados en el área de la SEF fueron los de El-Sayed y col.<sup>62</sup> y Aroca y col.<sup>22</sup>, donde se realizó un estudio de SEF con moléculas depositadas sobre superficies metálicas de plata y el uso de oxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) como elemento separador fluoróforo-metal, llegando a obtener factores de amplificación del orden de 100.

Por otra parte a comienzos del siglo XXI Lakowicz y col.<sup>10</sup> en un extenso artículo titulado "*Review Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications*", proponen que la amplificación de la señal fluorescente por efecto de superficies metálicas rugosas sería producto de las inusuales propiedades espectrales adquiridas al aumentar la velocidad de decaimiento radiativo como consecuencia de la interacción de fluoróforos con nanopartículas metálicas. Además, proporciona la literatura que resume los fundamentos teóricos y experimentales de fluoróforos en superficies metálicas.

Un año después Lakowicz y col.<sup>27</sup> realizan estudios en solución de fluoróforos contenidos entre dos placas de cuarzo cubiertas con nanopartículas de plata depositadas a través de soluciones coloidales del metal. Con este tipo de muestra estudian un conjunto de moléculas fluorescentes, llegando a la conclusión que las moléculas con menor rendimiento cuántico cercanas a superficies metálicas de plata muestran mayores factores de amplificación. Además muestran que experimentalmente el tiempo del estado excitado decrece cuando la intensidad de fluorescencia aumenta. Adicionalmente, hacen referencia a la transferencia de energía tipo Föster, limitándose a exponer la existencia de transferencia a través de los espectros de emisión del par dador-aceptor y a la disminución del tiempo de vida del dador, pudiendo concluir que la presencia de islotes de plata produce un importante aumento en la eficiencia del proceso de transferencia de energía.

Recientemente, dos importantes artículos publicados por Lakowicz y col.<sup>47, 63</sup> el primero de ellos, siguiendo la serie de "*Radiative Decay Engineering*", muestra una nueva forma de ver la interacción fluoróforo-nanoestructura, proponiendo que el efecto de amplificación del metal es debido a la emisión del plasmón proveniente de plasmones creados por el mismo fluoróforo en el estado excitado. En el segundo artículo, describe métodos de preparación de superficies metálicas cubiertas por nano-cilindros de plata los que se obtienen en solución coloidal y son depositados sobre un sustrato de vidrio previamente funcionalizado con APS (3-Aminopropiltriétoxisisilano).

Por otro lado, un artículo publicado a fines del 2005 por Kawasaki y Mine <sup>19</sup> tuvo un gran impacto en el área del SEF, demostrando que la amplificación máxima de la señal fluorescente se daría a una distancia comprendida entre 5-14 Å del metal, rango mucho más acotado y muy cerca de la superficie metálica que los hasta ahora reportados <sup>10,27</sup>, abriendo nuevamente la discusión respecto de la función que cumple la distancia molécula-metal. Además Kawasaki y Mine <sup>19</sup> proponen que no sólo la molécula puede ser fuente de fotones en un arreglo experimental como el que se muestra en la figura 2.1, sino que bajo ciertas condiciones de tamaño y forma las nanopartículas metálicas estas pueden ser parte del proceso de emisión y con ello aumentar la amplificación de la fluorescencia.

Finalmente y desde el punto de vista de la aplicaciones, existe un importante número de trabajos en el área de la biología y biomedicina, que se han venido desarrollando entre 2003 y 2005; estos trabajos han mostrado el importante aporte que tendrían la amplificación de señales espectrales tanto en la detección como análisis de moléculas y macromoléculas biológicas; algunos de los trabajos mas destacados son los de Geddes y col <sup>26, 64</sup>, Liu y col <sup>65</sup>, Ekgasit y col <sup>66</sup>, Mandal y col. <sup>67</sup> y Yao y col <sup>68</sup>.

## 2.7 Hipótesis de Investigación

La magnitud de la señal de fluorescencia amplificada por superficie depende en parte de la distancia entre el fluoróforo y la superficie metálica. Por lo tanto el espaciador debería tener una naturaleza tal que permita cumplir con la función de minimizar la transferencia de energía entre el analito y la superficie. Sobre esa base se podría establecer una relación entre el aumento de la fluorescencia por efecto de la superficie y el rendimiento cuántico de emisión molecular.

## **2.7.1 Objetivos generales**

Preparación de un nuevo sustrato metálico que cuente con los espaciadores adecuados, para ser usado en estudios de fluorescencia amplificada por superficie (SEF).

Detectar la presencia de capas protectoras sobre las nanopartículas metálicas a través de la espectroscopia vibracional (Raman o IR).

Cuantificar el efecto de amplificación sobre la fluorescencia de la nueva superficie metálica, comparándola con otras superficies metálicas de similares características.

## **2.7.2 Objetivos específicos**

La nueva superficie será utilizada en estudios de fluorescencia amplificada por superficie y su efectividad será contrastada con otras superficies metálicas, elaboradas tanto a partir de coloides de plata empleando especies reductoras como hidroxilamina o citrato.

En cuanto al trabajo experimental, es de nuestro interés estudiar tanto la amplificación de la fluorescencia y abordar los cambios en la cinética de desactivación de los sistemas moleculares, producto de la interacción con la superficie metálica.

# **CAPÍTULO 3**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

*Solamente aquel que construye el futuro tiene derecho a juzgar el pasado.*

**Friedrich Nietzsche (1844-1900) Filósofo alemán.**

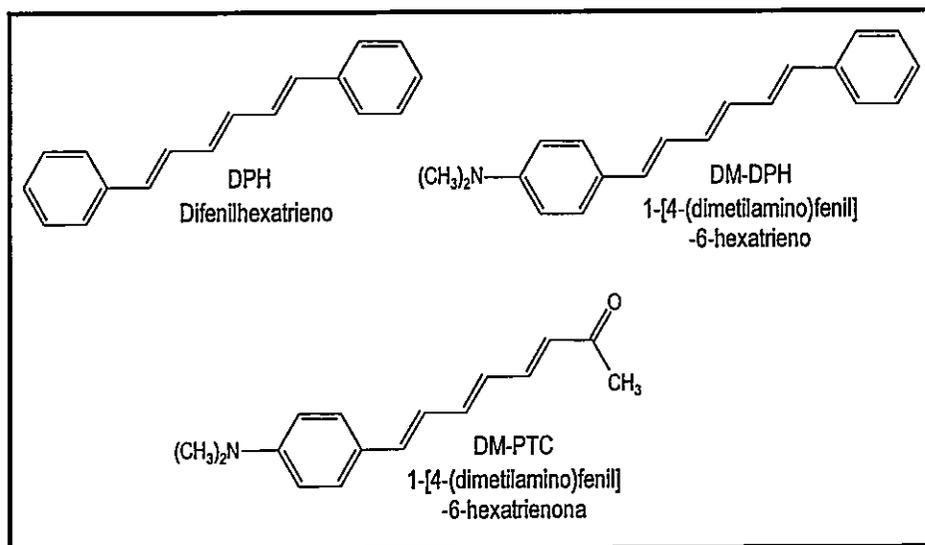
## 3.1 Reactivos, Preparación de Superficies y Muestras

### 3.1.1 Sistemas moleculares

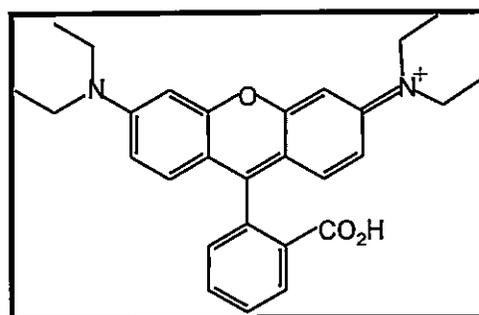
Los sistemas moleculares utilizados en esta tesis fueron difenilhexatrieno (DPH) y Rodamina-B adquiridos a Aldrich y 1-[4-(dimetilamino)fenil]-6-fenilhexatrieno (DM-DPH), adquirido a Fluka; todos ellos son usados sin purificación previa (figuras 3.1 y 3.2).

Por otro lado el sistema molecular 1-[4-(dimetilamino)fenil]-6-hexatrienona (DM-PTC) (figura 3.1) fue sintetizado en el laboratorio realizando una reacción de Claisen-Schmidt, partiendo del aldehído correspondiente (trans,trans-5-[4-(Dimetilamino)-fenil]-2,4-pentadienal) en acetona activada con NaOH 2M. La purificación del producto final se hace en un embudo de decantación, extrayendo la fase orgánica con éter etílico y finalmente el sólido es purificado mediante recristalización y sublimación a presión reducida a  $\sim 60^{\circ}\text{C}$ .

Para la preparación de las muestras en estado sólido se emplearán soluciones estándar de concentraciones variables entre  $10^{-2}$  M y  $10^{-7}$  en acetona o etanol.



**Figura 3.1 Estructuras de la serie Fenil-hexatrieno**

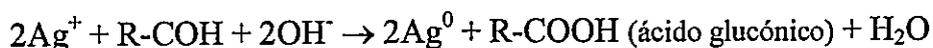


**Figura 3.2 Estructura molecular de Rodamina-B**

### 3.1.2 Preparación de nanopartículas metálicas

Para responder a la hipótesis propuesta en este trabajo de investigación se propone un método de fabricación de nanopartículas recubiertas con capas protectoras, en medio acuoso.

Se parte de un volumen de 30ml de  $\text{AgNO}_3$  ( $1.0 \times 10^{-3}$  M); a esta solución se le agregan 3.2 ml de glucosa (R-COH) de concentración  $1.1 \times 10^{-3}$  M. Esta disolución se calienta hasta  $85^\circ\text{C}$ , para luego agregar gotas de una solución de NaOH (0.08M). Esto genera un coloide de aspecto lechoso de color grisáceo, cuyo espectro de extinción presenta un máximo a 435 nm. En términos generales la reacción redox es el siguiente:



Por otra parte, como una forma de comparar las nuevas nanopartículas recubiertas, se preparan nanopartículas a través de métodos conocidos y reportados. Uno de los métodos de preparación de nanopartículas utilizados en esta tesis es el método reportado por Leopold y col. en el año 2003 <sup>69</sup>. Este método consiste en disolver 0.021 g de clorhidrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ ) en 5 ml de agua tridestilada; posteriormente se agrega a esta solución 4.5 ml de NaOH (0.1M). La mezcla resultante es adicionada a una solución de  $\text{AgNO}_3$  preparada a partir de 0.0178 g de sal en 90 ml de agua tridestilada. Con esto se obtiene una solución de aspecto lechoso de color amarillo-grisáceo, cuyo espectro de extinción presenta un máximo a 420 nm. En términos generales la reacción redox es el siguiente:



### 3.1.3 Preparación de películas metálicas

Una vez formadas las nanopartículas en solución es necesario fijar las nanopartículas a un soporte. Para lograr esto es necesario que los vidrios sean sometidos a un proceso de silanización. La forma en que se preparan los vidrios para el proceso de silanización es sumergirlos en una solución de etanol que contiene APS (3-Aminopropiltrietoxisilano) al 2% P/P por 2 horas; luego los vidrios son lavados con agua tridestilada y secados posteriormente con aire tibio y seco<sup>70, 71</sup>. En adelante vidrio silanizado, será equivalente a decir vidrio funcionalizado.

Luego de obtener los vidrios funcionalizados, se sumergen en solución coloidal de plata-hidroxilamina y plata glucosa por 24 horas o más produciéndose la fijación de las partículas metálicas sobre el vidrio.

### **3.1.4 Preparación de películas metálicas por evaporación**

La preparación de nanoestructuras de oro y plata, se realizó en una unidad de alto vacío. La evaporación de los metales se realizó a temperatura ambiente (25<sup>0</sup>C) y calentando el vidrio porta objetos a 200<sup>0</sup>C. El depósito del metal fue hecho a una presión de 10<sup>-6</sup> torr y a una velocidad de 0.5 Å/s; el espesor del film es monitoreado por un detector de cristal de cuarzo (XTC Inficon).

## **3.2 Preparación de Muestras para Espectroscopía Amplificada por Superficie**

La preparación de muestras para estudios de fluorescencia amplificada por superficie, implica que la superficie metálica esté recubierta con un separador que genere una distancia metal-molécula. Por ello se desarrolló un método mecánico, que permite recubrir con un polímero las superficies metálicas.

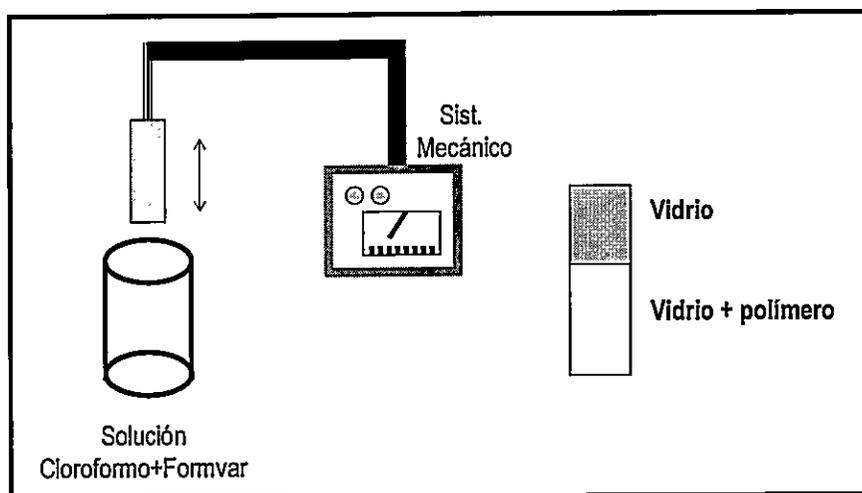
### **3.2.1 Uso del polivinil formal (Formvar) como espaciador**

La construcción de muestra para estudios SEF siempre ha tenido el inconveniente de separar las moléculas de la superficie metálica. Por ello en esta tesis se trabajó con Polivinil formal (Formvar), el que puede ser depositado en forma mecánica sobre la superficie de metal y así actuar como separador entre el metal y las moléculas.

La forma en que se deposita el polímero sobre el metal implicó la construcción de un sistema que controle por un lado la homogeneidad de la película de polímero y por otra parte el espesor depositado. Este problema fue solucionado por Roark y col. <sup>72</sup> en el año 1994, quienes trabajando con superficies metálicas lograron generar películas homogéneas y de diferente espesor, a través de un proceso de inmersión controlada en una solución de formvar en cloroformo.

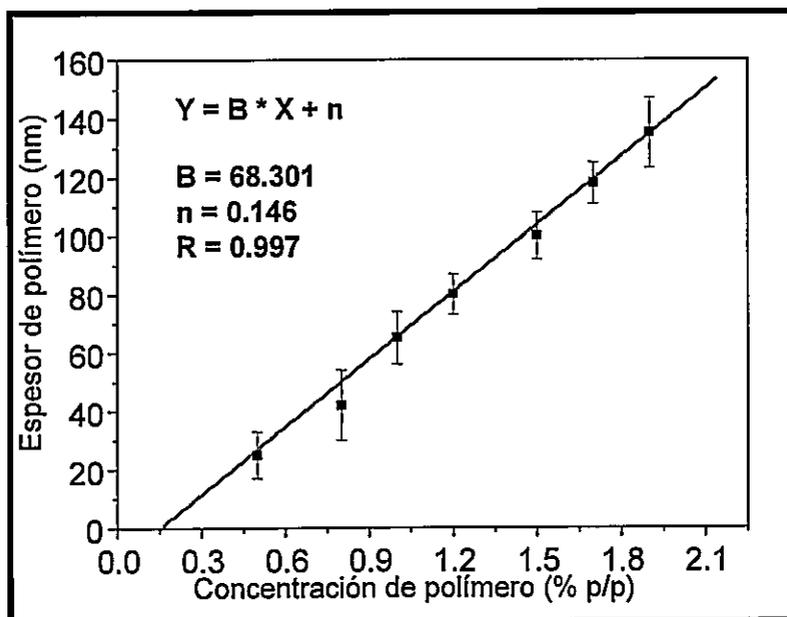
El la figura 3.3 se muestra un esquema del sistema mecánico que permite sumergir pequeñas piezas de vidrio y vidrio con metal en diferentes soluciones de diferente concentración de formvar en cloroformo. La velocidad de inmersión fue de 2 a 3 cm/min. El espesor de la película depositada sobre el metal fue controlado variando la concentración del polímero en la solución de cloroformo.

La concentración de formvar en cloroformo varió entre 0,3 % y 1.5%. Los valores del espesor fueron medidos posteriormente con la técnica de elipsometría. Los valores de espesor del polímero con sus respectivas concentraciones en solución fueron de: 0,5% ( $25 \pm 8$ nm), 0,8% ( $42 \pm 12$  nm), 1,0% ( $65 \pm 9$  nm), 1,2% ( $80 \pm 7$  nm), 1,5% ( $100 \pm 10$  nm), 1,7% ( $118 \pm 7$  nm) y 1,9% ( $135 \pm 12$  nm).



**Figura 3.3** Esquema del sistema mecánico utilizado para la fabricación de películas delgadas de polímero

Con los datos anteriores es posible construir una curva de calibración que permite saber el espesor de la capa de polímero depositado sobre vidrio y sobre las superficies metálicas en función de la concentración de formvar de la solución.



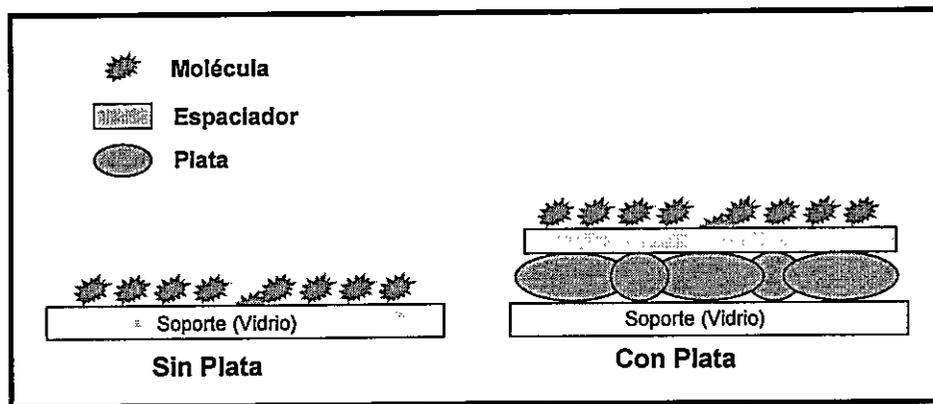
**Figura 3.4** Relación entre espesor de la película y concentración de Formvar en cloroformo

Con esta relación lineal  $y = 68.30x + 0.15$ , donde  $y$  corresponde al espesor del polímero y  $x$  a la concentración de polímero en solución, es posible calcular el espesor de la película de polímero sobre el vidrio y sobre la superficie de plata para cualquiera concentración de polímero.

Una vez construidas las muestras de metal-polímero y vidrio-polímero se procede a preparar las muestras que serán utilizadas en estudios de fluorescencia amplificada por superficie; para ello se depositan las especies sobre el polímero agregando  $5\mu\text{L}$  de una concentración  $\sim 10^{-4}\text{M}$  de moléculas en etanol.

Por otro lado las películas metálicas construidas con nanopartículas recubiertas no necesitan un polímero que actúa como espaciador por lo tanto se agrega directamente sobre la superficie entre 1 a 5  $\mu\text{L}$  de ( $10^{-4}\text{M}$  a  $10^{-7}\text{M}$ ) en etanol de los sistemas moleculares en estudio.

En la figura 3.5 se muestra un esquema general de la muestra que se obtiene con esta superficie, donde el espaciador corresponde a la capa que recubre las nanopartículas.



**Figura 3.5** Esquema de muestras para estudios de fluorescencia amplificada por superficie

Finalmente, para calcular la magnitud en que es amplificada la señal fluorescente por efecto de la superficie, se determina el Factor de Amplificación ( $FA$ ), donde la condición principal es que los espectros de emisión se midan en las mismas condiciones experimentales. La ecuación que define a  $FA$  es:

$$FA = \frac{\int I(\lambda)_{Ag} d\lambda}{\int I(\lambda)_V d\lambda} \quad (3.1)$$

donde  $\int I(\lambda)_{Ag} d\lambda$  y  $\int I(\lambda)_v d\lambda$  corresponden al área integrada de los espectros de fluorescencia de emisión sobre la superficie de plata y vidrio, respectivamente.

## **3.3 Instrumentos**

El trabajo experimental necesario para desarrollar estudios de espectroscopia amplificada por superficie implica, no sólo el uso de equipos de carácter espectroscópico, sino que además instrumentos que permitan la caracterización de superficies metálicas. Por ello es necesario utilizar un conjunto de instrumentos, que pasamos a detallar en las siguientes secciones.

### **3.3.1 Estudios de fluorescencia y fluorescencia amplificada por superficie (SEF)**

En los estudios de espectroscopía de fluorescencia amplificada por superficie y estudios de fluorescencia normal en estado estacionario, se utilizaron dos instrumentos: Por un lado, un espectrofluorímetro de conteo de fotones ISS PC1 equipado con lámpara de Xe de 300 watts y 2 monocromadores (uno de excitación y el otro de emisión). Las ranuras o pasos de luz utilizados fueron de 0,5 a 0.25 mm lo que permite un ancho de banda de 4 nm y 2 nm, respectivamente. El detector de este equipo es un tubo fotomultiplicador. Además, el equipo está conectado a un computador con el programa ISS que permite la adquisición de datos y espectros. En la figura 3.6 se muestra un esquema del equipo de fluorescencia y en la figura 3.7 se muestra una fotografía del compartimiento de muestra utilizado para las mediciones con iluminación frontal.

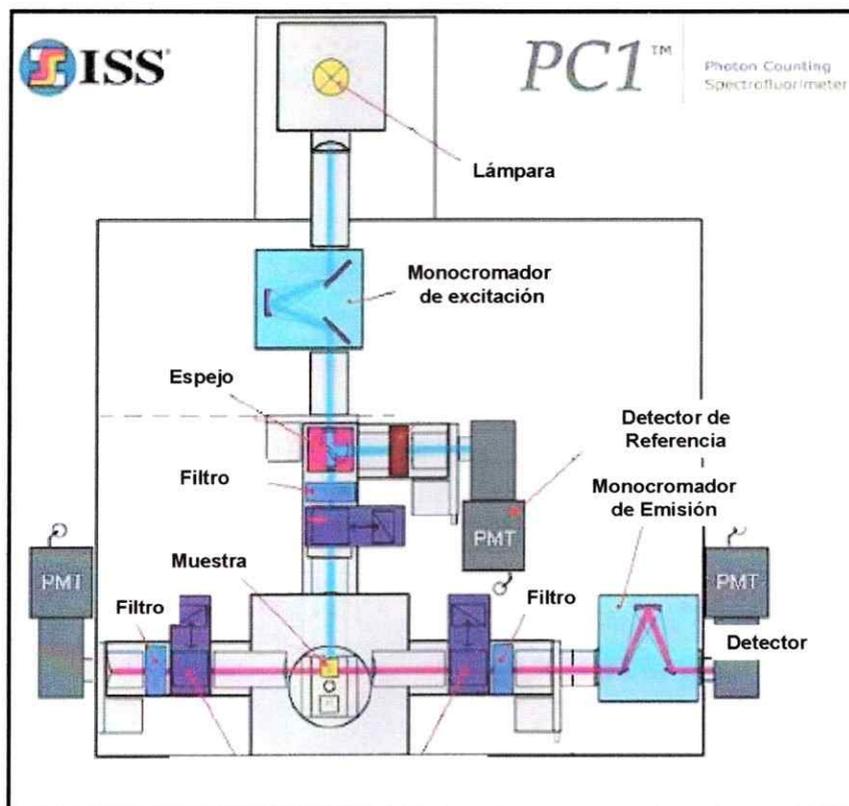


Figura 3.6 Esquema del equipo de fluorescencia

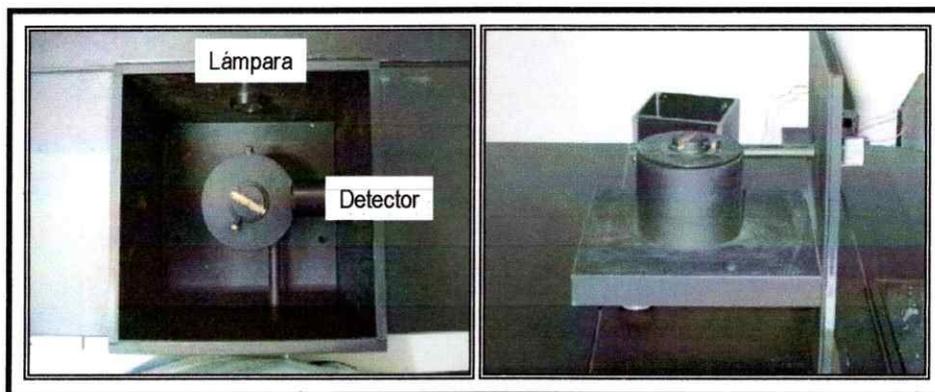
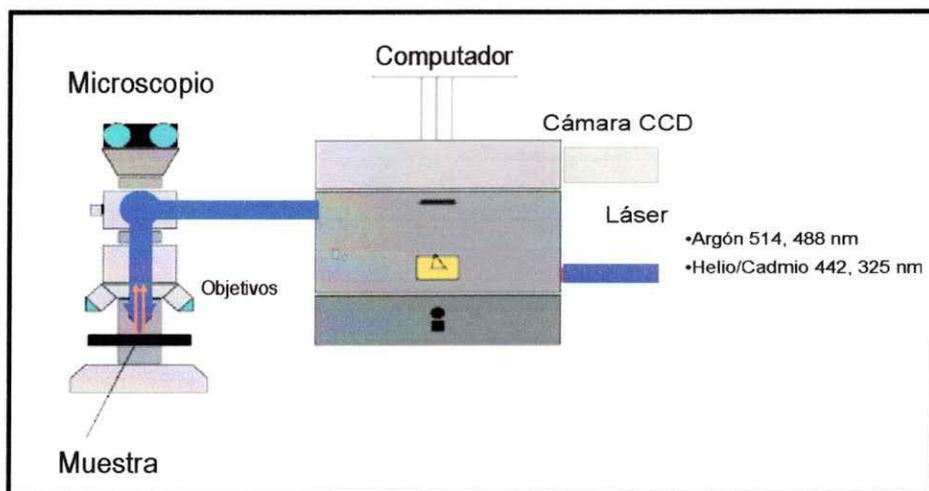


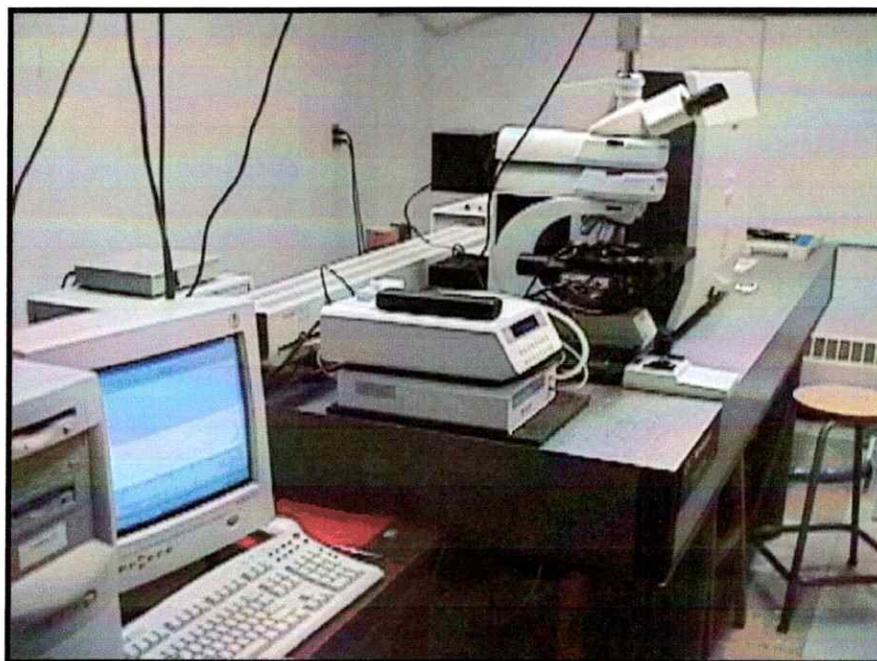
Figura 3.7 Compartimiento de muestra para iluminación frontal

Si se utiliza la iluminación frontal, es necesario determinar el ángulo al cual se iluminará la muestra, teniendo como condición este ángulo genere la menor dispersión de luz al detector. Se concluyó que el mejor ángulo de iluminación es de 30 grados respecto de la normal a la superficie de la muestra. La obtención de este valor se detallará en el capítulo 7.

El otro equipo utilizado para realizar estudios de fluorescencia y fluorescencia amplificada (SEF) fue un microscopio Raman Renishaw Research RM2000, que permite el registro no sólo de espectros de fluorescencia sino que además de espectros Raman. El equipamiento de este instrumento es un microscopio marca Leica, con un detector CCD cámara electrónicamente refrigerada y un computador conectado en línea para la adquisición de los espectros a través del programa GRAMS 4.0. Las líneas láser de excitación son dos; una de Argón ionizado con las líneas de excitación (514nm y 488nm) y la otra de Helio/Cadmio con las líneas de excitación (325 nm y 442nm). La potencia de láser aplicada se mantuvo en un intervalo de 1.0 a 3.0 mW con una resolución espectral de 0.05 nm. Los espectros resultantes se obtienen utilizando objetivos de 50x y 25x. En la figura 3.8 se muestra un esquema que representa el sistema de micro-Raman empleado y en la figura 3.9 se muestra una fotografía del equipo Raman Renishaw Research RM2000.

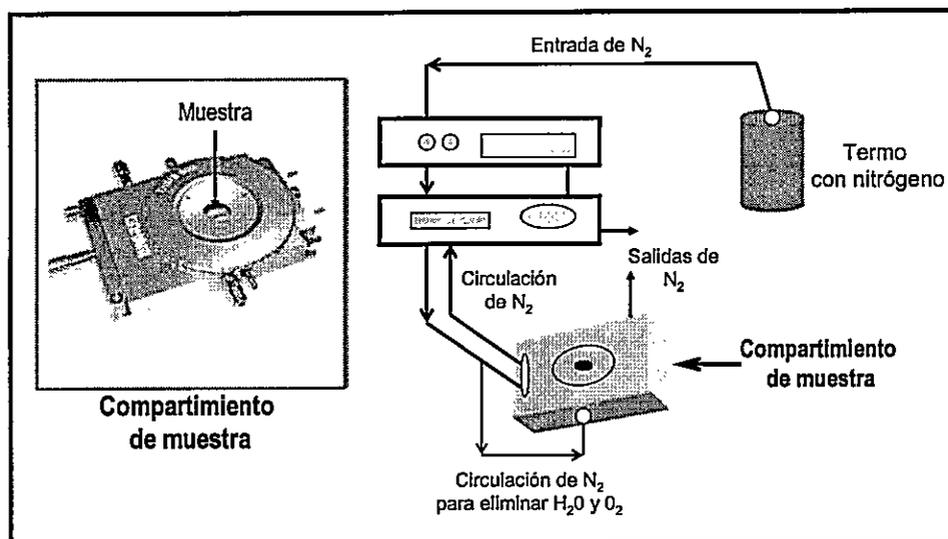


**Figura 3.8** Esquema del sistema micro-Raman empleado en las mediciones



**Figura 3.9** Fotografía del equipo Raman Renishaw Research RM2000

Este equipo puede ser conectado a un sistema externo que permite controlar la temperatura de la muestra. Este dispositivo es controlado desde el computador conectado al equipo y permite trabajar a temperaturas que van desde  $0^{\circ}\text{C}$  ( $273^{\circ}\text{K}$ ) a  $-180^{\circ}\text{C}$  ( $93^{\circ}\text{K}$ ). La muestra es colocada dentro de un compartimiento sellado que se conecta a un termo de Nitrógeno líquido. El  $\text{N}_2$  líquido cumple dos funciones, reducir la temperatura de la muestra y recircular en el interior del compartimiento de muestra para eliminar el vapor de agua y el oxígeno, que interfieren en la medición. En la figura 3.10 se muestra un esquema de este dispositivo.



**Figura 3.10** Esquema del dispositivo para el control de la temperatura

### 3.3.2 Estudios cinéticos

Para realizar las mediciones de tiempo de vida en el dominio de la frecuencia, la muestra es irradiada con una fuente de excitación modulada (en intensidad) y de forma sinusoidal. La interacción de la excitación modulada con la muestra genera una onda de emisión que tiene un desplazamiento en fase con respecto a la excitación y al mismo tiempo una diferencia en intensidad o modulación relativa a la excitación, siendo estos dos parámetros los que se asocian al curso de decaimiento radiativo o tiempo de vida. En la figura 3.11 se muestra un esquema de los parámetros que se asocian al curso de decaimiento radiativo, donde  $\phi$  y  $m$  son los parámetros empelados en la determinación del tiempo de vida de una muestra fluorescente.

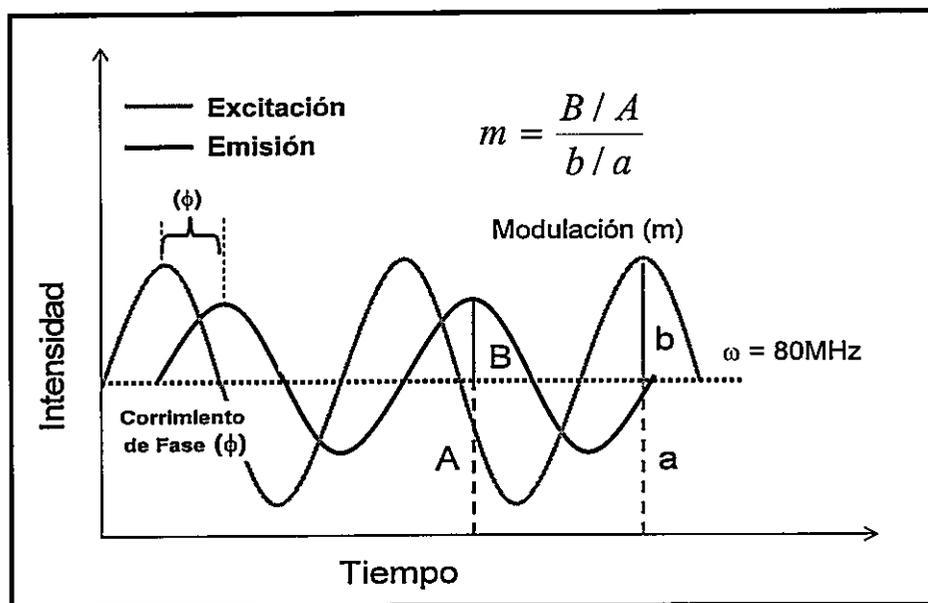


Figura 3.11 Diagrama de desfase ( $\phi$ ) y razón de modulación ( $m$ ) medido entre la onda de excitación y emisión.

Los tiempos de vida son calculados de acuerdo a las ecuaciones 3.2 y 3.3 donde  $P_\omega$  es el corrimiento de fase y  $M_\omega$  es relativo a la modulación.

$$\tan P_\omega = \omega \tau_P \quad (3.2)$$

$$M_\omega = (1 + \omega^2 \tau_M^2)^{-1/2} \quad (3.3)$$

Los valores medidos de fase y modulación, son analizados a través de una suma de exponenciales descritos en las siguientes ecuaciones:

$$I(t) = \sum_i^n f_i e^{-t/\tau_i} \quad (3.4)$$

con

$$\sum_i^n f_i = 1 \quad (3.5)$$

donde  $\tau_i$  que es el tiempo de la componente  $i$  y  $f_i$  es el aporte de cada fracción individual de la componente  $i$  a la intensidad de total de fluorescencia. Para analizar los datos obtenidos se realiza un ajuste de mínimos cuadrados no lineales, los datos de fase y pérdida de la modulación. Este ajuste puede ser mono o biexponencial dependiendo de los valores obtenidos experimentalmente; el parámetro que juzga la calidad de este ajuste es el valor de Chi cuadrado reducido ( $\chi^2_{red}$ ) definido por la ecuación 3.6.

$$\chi^2_{red} = \frac{\sum_1^n \left\{ \left( \frac{P_c - P_m}{\sigma^P} \right)^2 + \left( \frac{M_c - M_m}{\sigma^M} \right)^2 \right\}}{(2n - f - 1)} \quad (3.6)$$

Según esta ecuación la suma se realiza sobre las  $n$  medidas realizadas en el rango de frecuencia, donde  $f$  es el número de parámetros libres  $P$  y  $M$  corresponden a los valores de desfase y modulación medidos. Los subíndices  $c$  y  $m$  indican los valores calculados y medidos, respectivamente. Los valores de  $\sigma_P$  y el  $\sigma_M$  corresponden a las desviaciones de estándar de cada valor medido de fase y de modulación.

El análisis de estos parámetros se realizó por medio del programa Globals Unlimited Software <sup>73</sup>, donde se fija los valores de  $\sigma_P$  y  $\sigma_M$  en  $0.2^\circ$  y  $0.004$ , respectivamente. En la figura 3.12 se muestra un diagrama de la intensidad de decaimiento en el dominio de la frecuencia para Rodamina-B en etanol; en el se observa que a medida que aumenta la frecuencia, la modulación disminuye y la fase aumenta.

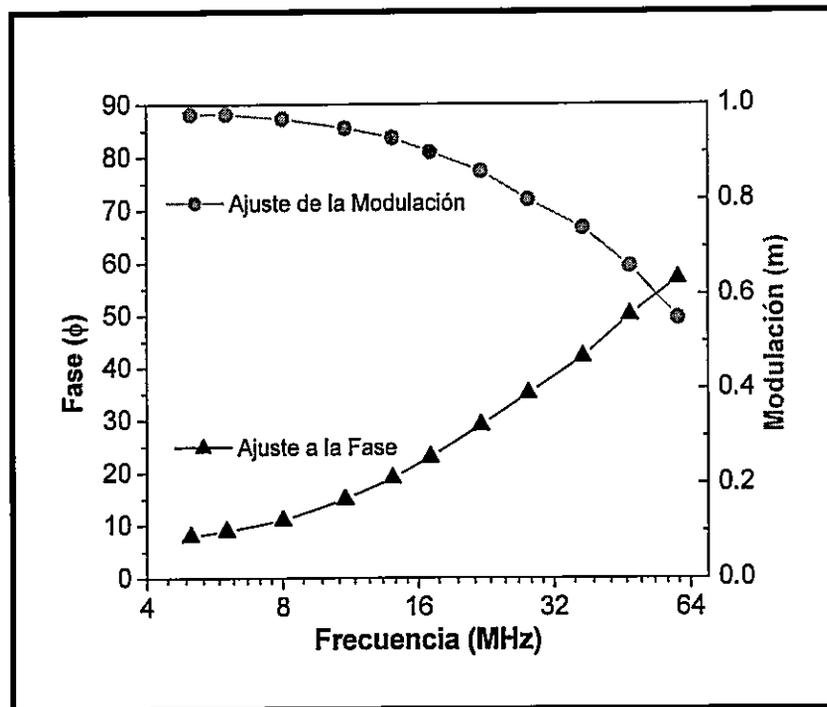


Figura 3.12 Datos de tiempo de vida de Rodamina-B en etanol, en función de la frecuencia, la fase  $\phi$  ( $\blacktriangle$ ) y modulación  $m$  ( $\bullet$ )

### **3.3.3 Espectroscopía de absorción UV-VIS**

Los espectros de absorción UV-visible de los sistemas moleculares en solución fueron registrados con un espectrofotómetro UV-visible Perkin-Elmer Lambda-11, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Además, los espectros de extinción (absorción + dispersión) de las soluciones coloidales y las películas de plata con y sin polímero, también fueron registradas con este instrumento.

### **3.3.4 Microscopía electrónica**

La caracterización del coloide de plata-glucosa y de las superficies generadas por este coloide fueron hechas con microscopía de alta resolución con un Electron Microscope JEOL 6400f con una resolución de 4 nm.

### **3.3.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

La caracterización morfológica de las superficie de plata-glucosa fue realizada con un equipo de microscopía de fuerza atómica AFM, Nanoscope III y las imagenes obtenidas fueron digitalizadas con el software Nanoscope 6.11r.

# **CAPÍTULO 4**

## **SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Hay dos maneras de difundir la luz... ser la lámpara que la emite, o el espejo que la refleja.*

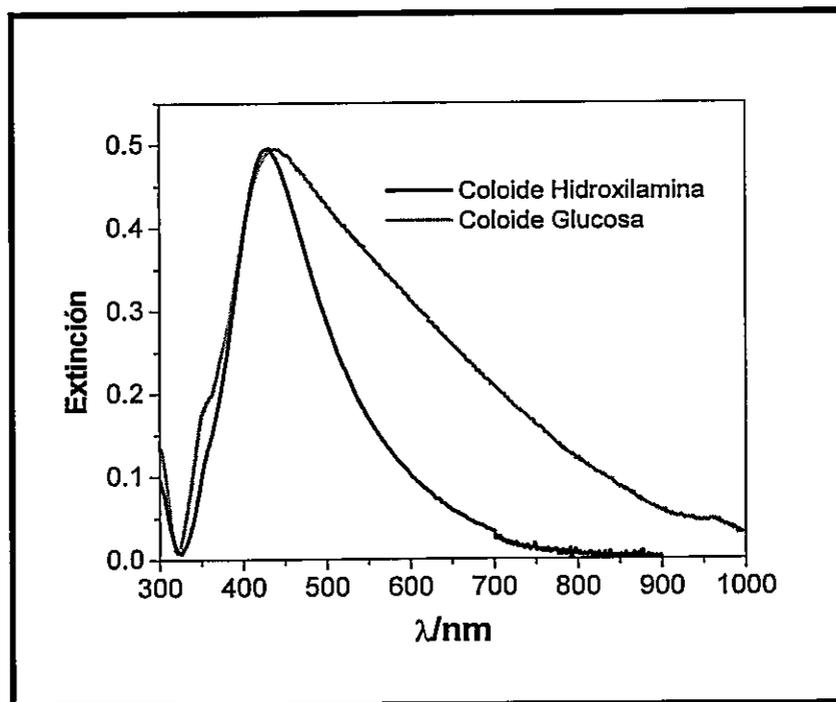
**Lin Yutang (1895-1976) Escritor y filólogo chino.**

## **4.1 Caracterización UV-visible de los Coloides de Plata y Microscopía Electrónica de los Coloides de Plata**

La manera usual de caracterización de coloides y/o film de nanopartículas metálicas es a través de espectros de extinción UV-visible, ya que la longitud de onda del máximo y la determinación del ancho de banda a media altura en los espectros de extinción permiten extraer información cualitativa acerca de la distribución de tamaños de las nanopartículas.

En esta tesis se caracterizaron dos soluciones coloidales de plata una con hidroxilamina y la otra con glucosa. En la figura 4.1 se muestran los espectros de extinción para el coloide de hidroxilamina y glucosa respectivamente. El espectro de extinción del coloide de plata-hidroxilamina se caracteriza por un máximo centrado en 420 nm y un ancho de banda de 135 nm, mientras que el espectro de extinción para el coloide de plata-glucosa tienen un máximo centrado en 435 nm, un “hombro” en 360 nm y un ancho de banda de 350 nm. Que el máximo del espectro de extinción para el coloide de hidroxilamina sea menor que el coloide de glucosa indica que el tamaño promedio de las nanopartículas para el coloide de hidroxilamina es menor que para el coloide de glucosa.

Además el si comparamos los anchos de banda a media altura para los espectros anteriores se observa que, el ancho de banda del coloide de glucosa es 2 veces mayor que el ancho de banda para el coloide de hidroxilamina (300 nm y 150nm, respectivamente). Esto indica que el coloide de glucosa tiene una distribución de tamaños de nanopartículas, más amplia que el coloide hidroxilamina.



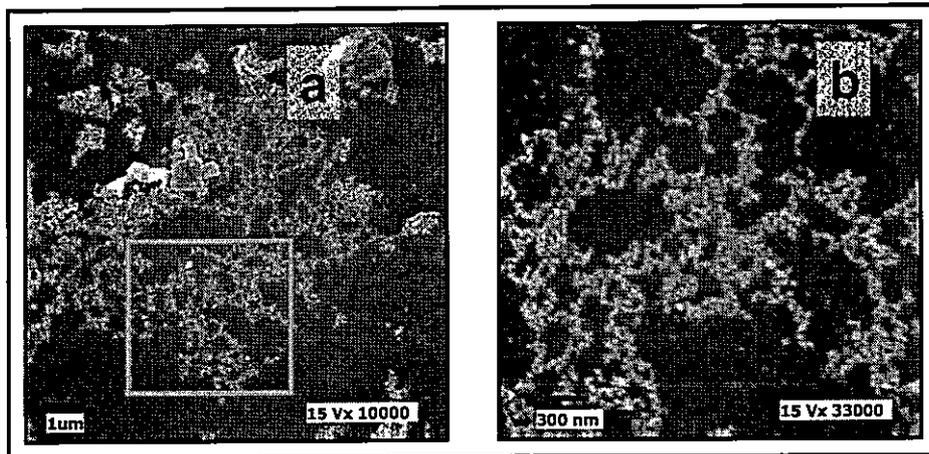
**Figura 4.1** Espectros de extinción de coloides de plata-hidroxilamina y plata glucosa

Por lo tanto y de acuerdo con los resultados anteriores, se puede concluir que diferentes métodos de preparación de nanopartículas entregarían diferentes distribuciones de tamaños de nanopartículas metálicas.

Para corroborar esta conclusión se llevo a cabo una caracterización con microscopía electrónica, para cada uno de los coloides.

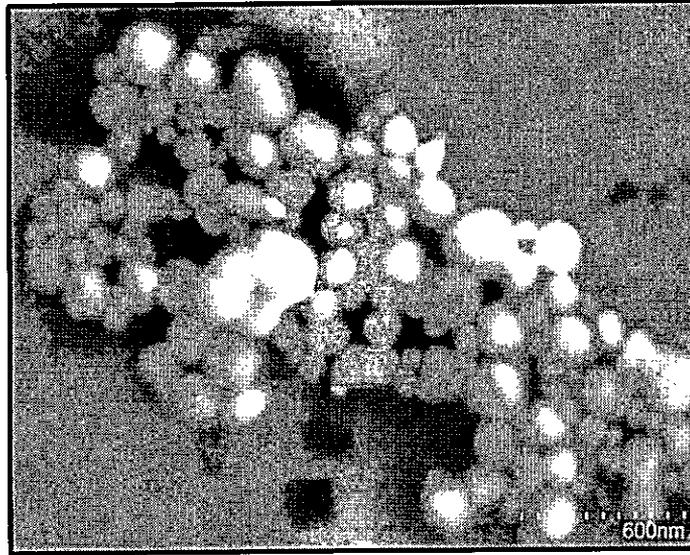
En la figura 4.2 se muestran imágenes del coloide de hidroxilamina con diferente aumento, la imagen a corresponde a un aumento de 10000 veces y la imagen b corresponde a un aumento 33000 veces de la sección señalada en rojo. El análisis de la imagen solo permite concluir que las partículas coloidales forman agregados tipo fractales. En relación a la literatura, trabajos publicados por Leopold y Leyton 69, 74 describen que este coloide está compuesto mayoritariamente por

nanopartículas esféricas de diámetros en torno a 60 nm, con una baja distribución de tamaños, además el coloide forman agregados fractales. Además el estudio de Leopold y col.69 analiza la distribución de tamaños de las nanopartículas en la solución, datos que serán usados en la siguiente sección.



**Figura 4.2** Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) del coloide de plata-hidroxilamina

Por otro lado también fue caracterizado el coloide de plata-glucosa con microscopia electrónica y el resultado de esto se muestra en la fotografía de la figura 4.3. El tamaño de las nanopartículas observados varían entre 40 nm y 200 nm de diámetro; esto indica una amplia dispersión de tamaños, hecho que coincide con el análisis del ancho de banda a media altura (350 nm) del espectro de extinción de la figura 4.1. Además, en la figura 4.3 se observa que las partículas del coloide presentan varias formas geométricas; esferas entre 20 y 40 nm diámetro, esferoides que van desde 40 nm a 80 nm diámetro y agregados amorfos de 200 a 300 nm de diámetro.



**Figura 4.3** Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) del coloide plata-glucosa

### 4.1.1 Estudio estadístico de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata en solución

Este estudio se realiza con el objetivo de resumir los resultados expuestos en la sección 4.1. En la figura 4.4 se muestra la distribución de tamaños encontrada para el coloide de plata-glucosa (b) y la distribución de tamaños reportado por Leopold y col. el año 2003<sup>69</sup> para el coloide de hidroxilamina (a).

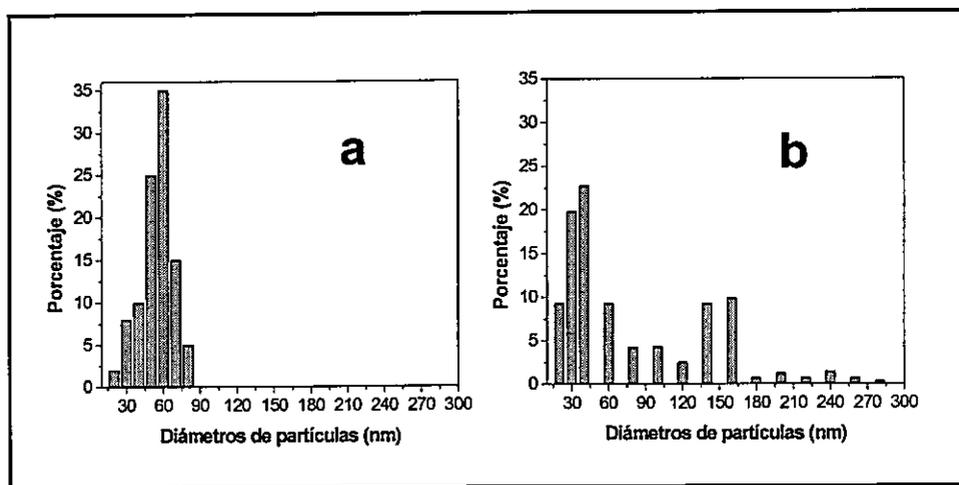


Figura 4.4 Histogramas de distribución de tamaños para el coloide de plata-hidroxilamina (a)<sup>69</sup> y coloide de plata-glucosa (b)

Al observar la figura 4.4, la distribución de tamaños encontrada para el coloide de plata-glucosa es totalmente distinta a la distribución de tamaños reportada para el coloide de hidroxilamina <sup>69</sup>. El coloide de plata-hidroxilamina genera partículas en torno a 60 nm de diámetro, mientras que el coloide de plata-glucosa genera una distribución de tamaños que puede separarse en dos partes; partículas cercanas a 40 nm de diámetro y otra distribución que se centra en 150 nm de diámetro.

Con lo anterior se puede concluir que los análisis de los anchos de banda y de los máximos en los espectros de extinción permiten prever la distribución de tamaños para solución coloidal. Además, diferentes métodos de preparación de soluciones coloidales entregan distintos tamaños y formas de nanopartículas.

## 4.2 Caracterización UV-visible y Microscopía Electrónica de las Superficies de Plata

Las partículas metálicas de la solución coloidal son fijadas a vidrio funcionalizados formando películas delgadas de 5 a 20 nm de espesor, las que son caracterizadas a través de su espectro de extinción. En las figuras 4.5 y 4.6 se muestran dichos espectros, además de los espectros de las soluciones coloidales, con el objetivo de observar los cambios que presentan las nanopartículas al ser fijadas sobre vidrio.

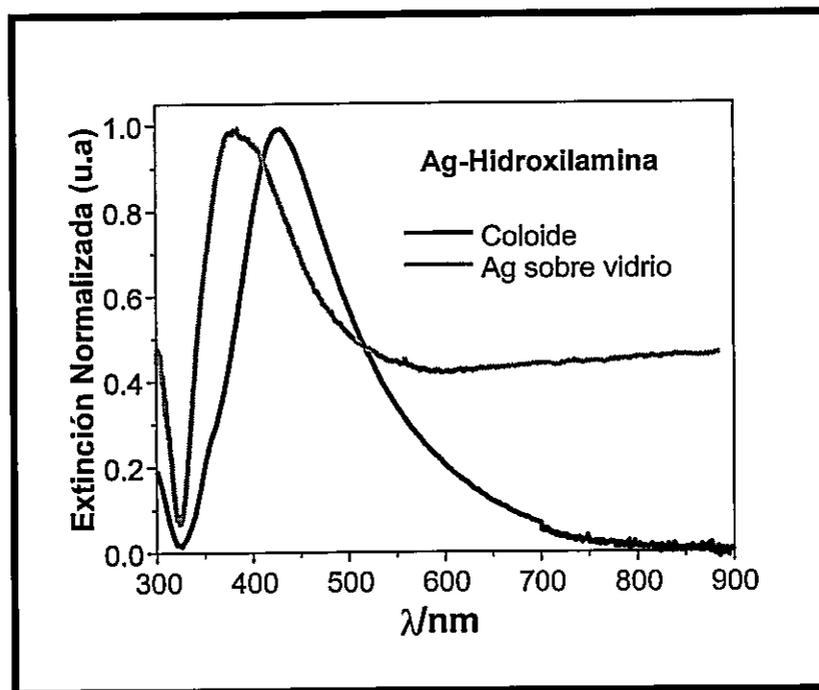


Figura 4.5 Espectros de extinción para nanopartículas en solución coloidal y depositada sobre vidrio de plata-hidroxilamina.

Si analizamos el espectro de la figura 4.5, se observa que la película de plata presenta un máximo a 385 nm. Además se observa un corrimiento al azul de aproximadamente 40 nm, debido al cambio en la constante dieléctrica del medio al pasar de una solución acuosa a aire.

Por otra parte el espectro de extinción de la solución coloidal de Ag-glucosa y el de sus partículas depositadas sobre vidrio, mostrado en la figura 4.6, se observan importantes cambios, ya que, el espectro de la película de plata presenta dos máximos a 380 y 420 nm. Además de una banda ancha entre 620 y 1000 nm. Además, se observa un corrimiento al azul de aproximadamente 35 nm, debido al cambio en la constante dieléctrica del medio al pasar de una solución acuosa a aire.

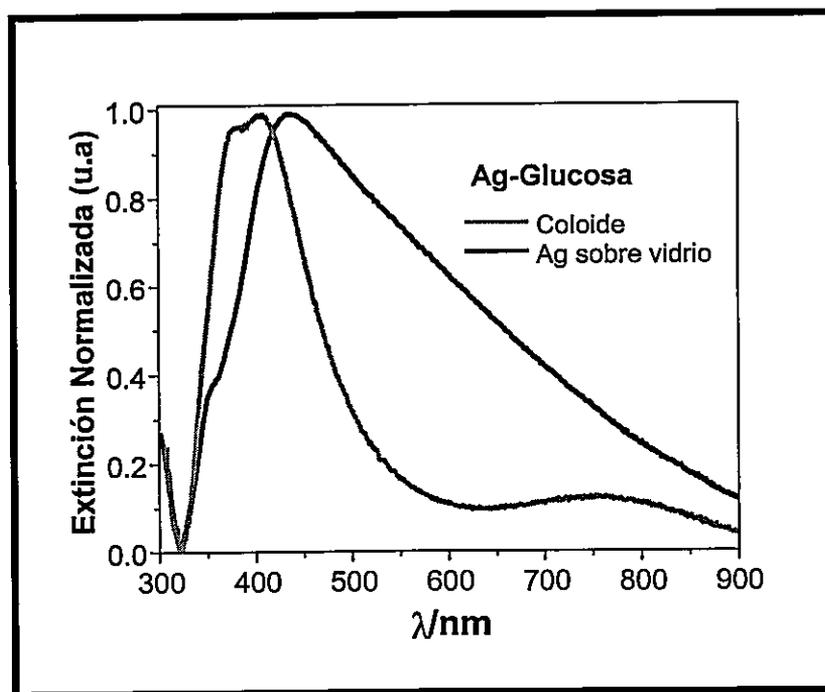
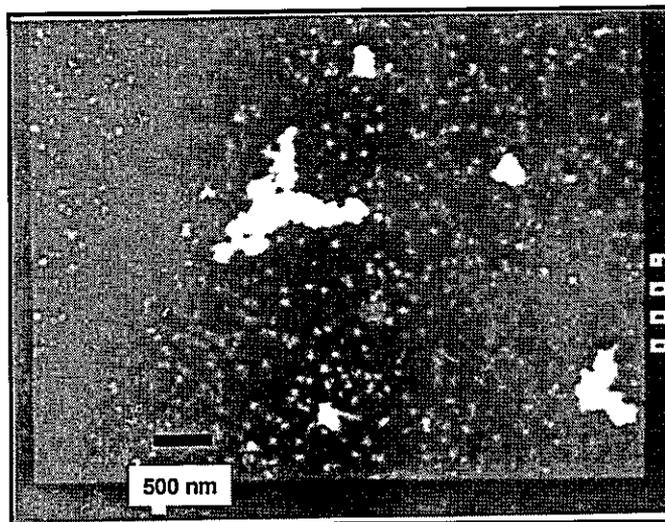


Figura 4.6 Espectros de extinción para nanopartículas en solución coloidal y depositada sobre vidrio de plata-glucosa.

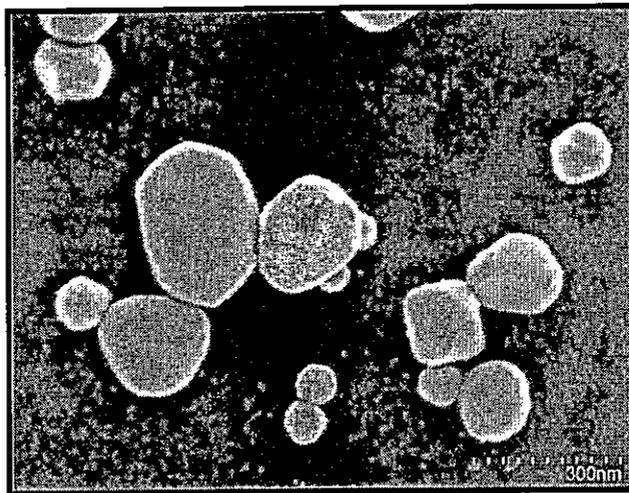
Además se realizó el análisis con microscopía electrónica para las películas de plata obtenidas a partir de los coloides. En las figuras 4.7 y 4.8 se muestran las imágenes de las microscopías para la superficie de Ag-hidroxilamina y la superficie de Ag-glucosa respectivamente.



**Figura 4.7** Microscopía electrónica de barrido (SEM) para la superficie de plata-hidroxilamina

Si analizamos la figura 4.7 observamos agregados entre 200 y 500 nm, además las pequeñas partículas que se observan en forma puntos blancos correspondientes a formas esféricas entre 50 y 110 nm de diámetro. Estos valores coinciden en los datos reportados por Leopold<sup>69</sup> y Leyton<sup>74</sup>.

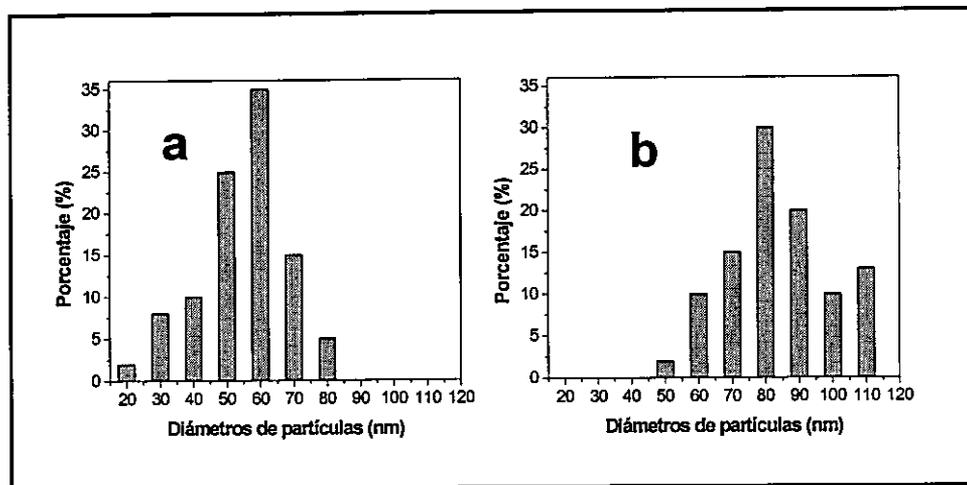
Por otra parte la microscopía electrónica (SEM) de la superficie de plata-glucosa se muestra en la figura 4.8. En esta se observa que la superficie metálica está compuesta por partículas de diversas formas y tamaños; esferoides de 75 nm de diámetro, elipsoides de al menos 300 nm diámetro en su eje mayor y partículas sin forma definida de diámetros en torno a 100 nm. Con este estudio es posible inferir que las partículas de gran tamaño y de forma elipsoidal podrían dar origen a la banda entre 620 y 1000 nm observada en el espectro de extinción de la figura 4.6.



**Figura 4.8** Microscopía electrónica de barrido (SEM) del sustrato de plata-glucosa

## 4.2.1 Estudio estadístico de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata sobre vidrio

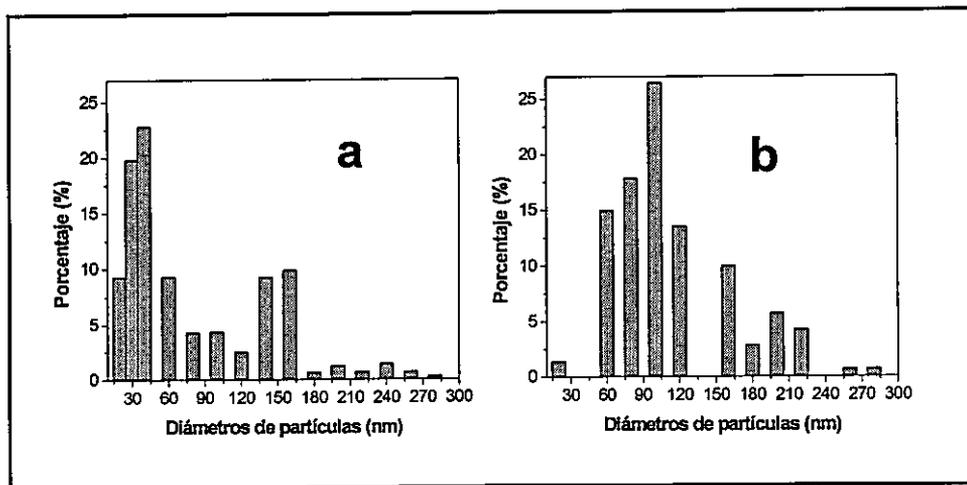
Este estudio se realiza con el objetivo de resumir los resultados expuestos en la sección 4.2. En la figura 4.9 se muestran las distribuciones de tamaños encontradas para el coloide de plata-hidroxilamina<sup>69</sup> y la película de plata-hidroxilamina Leopold<sup>69</sup>. En la figura 4.10 se muestra la distribución de tamaños encontrados para el coloide de plata-glucosa y la película de plata-glucosa.



**Figura 4.9** Histograma de distribución de tamaños para la solución coloidal de plata-hidroxilamina (a) y de la superficie de plata-hidroxilamina (b)

Al observar el histograma de la figura 4.9 se pueden concluir que existe un leve aumento de los tamaños de las nanopartículas al pasar de la solución coloidal a las partículas depositadas sobre vidrio, ya que el tamaño promedio de las partículas en solución es 55 nm de diámetro con una desviación estándar de 22 nm, mientras que para las partículas depositadas sobre vidrio se observa un tamaño mayor de

82 nm de diámetro con un desviación estándar de 30 nm. Además el leve aumento en la desviación estándar de 22 nm para partículas coloidales a 30 nm para las partículas depositada sobre vidrio podría explicar el aumento del ancho de banda de 25 nm que tiene el espectro de extinción de la superficie de plata-hidroxilamina con respecto a la solución coloidal.



**Figura 4.10** Histograma de distribución de tamaños para la solución coloidal de plata-glucosa (a) y de la superficie de plata-glucosa (b)

Por otra parte, si analizamos la figura 4.10, podemos decir que existe un aumento en el tamaño de las nanopartículas al pasar de la solución coloidal a las partículas depositadas sobre vidrio, ya que el mayor porcentaje de partículas encontrados para la superficie está en el segmento 60-120 nm, mientras que en la solución coloidal el mayor porcentaje se encuentra en el segmento 20-60 nm. Con esto se muestra que hay aumento en el tamaño de las nanopartículas y una mayor distribución de los tamaños. Este cambio en la distribución de tamaño se debería a que las partículas del coloide se depositan sobre el vidrio funcionalizado formando

islas, las que con el tiempo van concentrando el depósito sobre el vidrio, perdiendo con ello los diámetros menores a 60 nm; este hecho es propuesto por algunos autores como un método para generar crecimiento de partículas sobre vidrio funcionalizado <sup>70, 72</sup>.

## 4.2.2 Caracterización vibracional del sustrato de plata recubierto con moléculas orgánicas

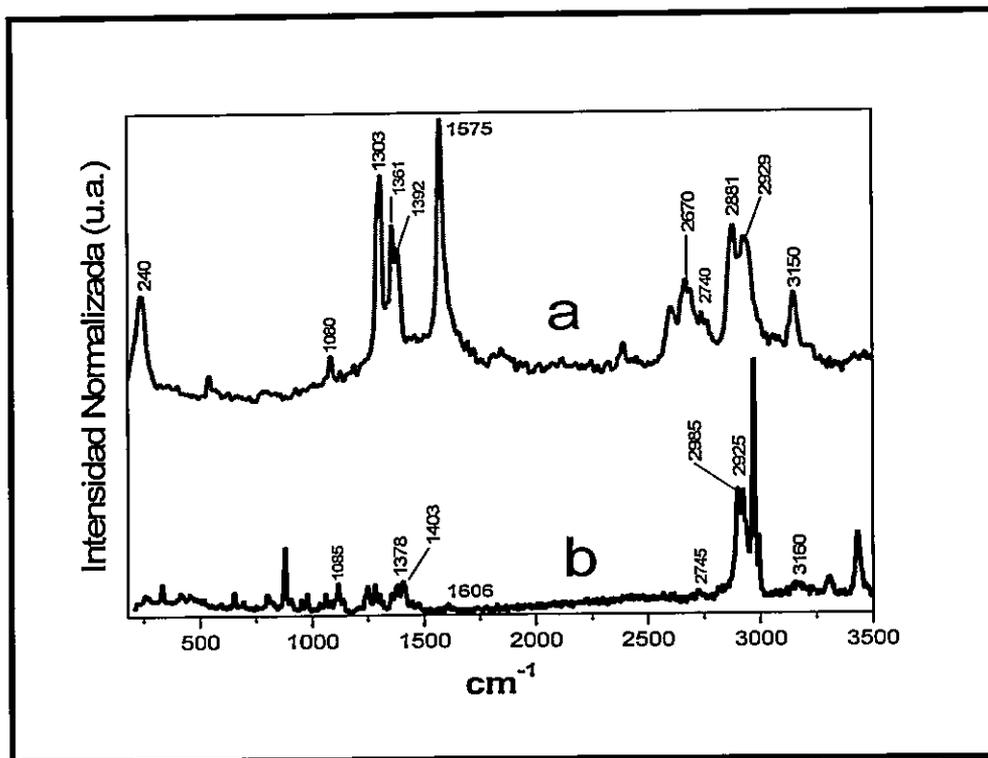
De acuerdo al método empleado en la obtención del coloide de plata, reducido por glucosa, se espera que las partículas de plata en solución queden recubiertas con residuos provenientes del elemento reductor empleado. Dado que el coloide de plata se obtiene en un medio básico, nos conduce a pensar que la glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), se oxida a ácido glucónico ( $C_6H_{12}O_7$ ), molécula que finalmente debiera estabilizar las nanopartículas en solución.

Una forma de comprobar experimentalmente que las partículas tiene un recubrimiento orgánico es mediante la espectroscopía Raman. Si existen moléculas interactuando con las partículas metálicas se debería observar el espectro Raman de las moléculas absorbidas sobre la superficie metálica (espectro SERS).

Este estudio se realizó con las partículas de coloide fijadas sobre vidrio y el equipo utilizado fue un Raman Renishaw Research RM2000.

En la figura 4.11, se muestra el resultado de este estudio, donde el espectro SERS de la superficie de Ag-ácido glucónico se compara con el espectro Raman de cristales de ácido glucónico (Aldrich 95% pureza). En ambos espectros existe coincidencia en algunas bandas en las zonas  $1200-1400\text{ cm}^{-1}$  y  $2500-3000\text{ cm}^{-1}$ , las cuales corresponden a vibraciones  $\nu C-C$  y  $\nu C-H$ , respectivamente. La presencia de dos bandas en el espectro (a) ( $240\text{ cm}^{-1}$  y  $1575\text{ cm}^{-1}$ ) y que no aparecen en el espectro (b) permite establecer con certeza la interacción del ácido glucónico con las partículas metálicas. En este sentido la banda a  $240\text{ cm}^{-1}$  está bien caracterizada y corresponde a un complejo Ag---O (Plata-Oxígeno) que suele aparecer entre 200 y

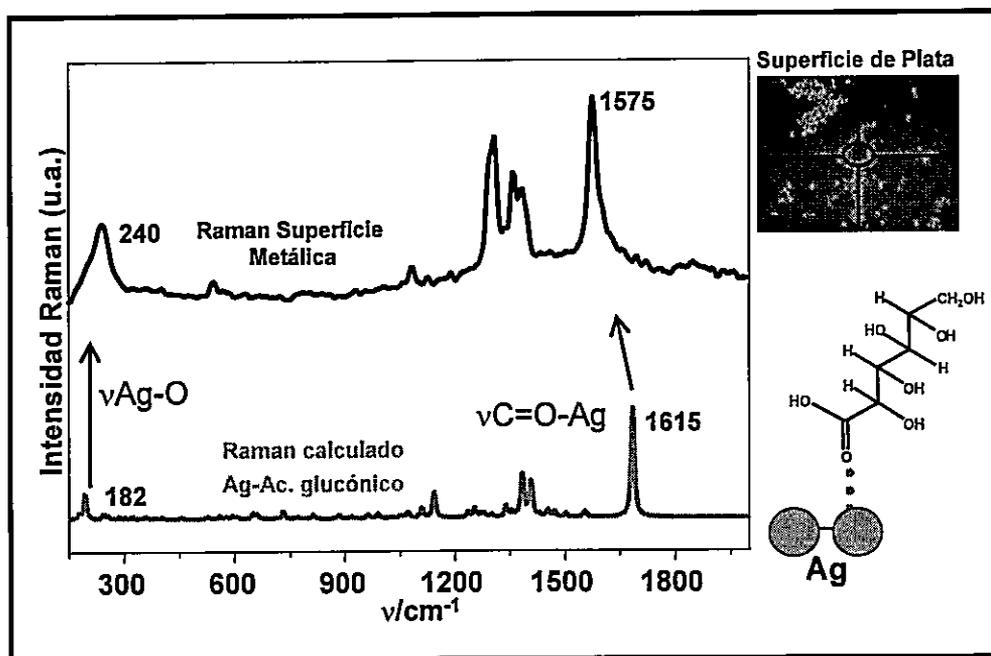
$250\text{ cm}^{-1}$  <sup>75</sup> Esta banda es dependiente del átomo de la molécula implicada en la interacción, así como también de la fuerza de unión metal-molécula.



**Figura 4.11** Espectro SERS de la superficie de la Plata-ácido glucónico (a) y espectro Raman de cristales de ácido glucónico (b)

Por otro lado la banda a  $1575\text{ cm}^{-1}$ , podría ser la misma que con una baja intensidad aparece en  $1606\text{ cm}^{-1}$ , en el espectro (b) y que corresponde a una vibración  $\nu\text{C=O}$ .

Con el objetivo de precisar la interacción de las moléculas de ácido glucónico con la superficie de plata se realizó un cálculo DFT (B3LYP/3-21G) para un modelo simplificado de interacción analito-superficie, ácido glucónico y dos átomos de plata. El espectro calculado resultante para un complejo monodentado en que la unión metal ligante ocurre a través del C=O del ácido y la plata reproduce muy aproximadamente el espectro SERS experimental (ver figura 4.12)



**Figura 4.12** Espectro Raman de la superficie metálica y espectro Raman calculado para una molécula de ácido glucónico y dos átomos de plata

Como se observa en la figura 4.12 el cambio en frecuencia de la banda a  $1575\text{ cm}^{-1}$  es indicio de la interacción, ya que la longitud del enlace C=O aumenta producto de la formación del enlace C=O---Ag, por ello esta vibración aparece a una menor frecuencia que lo usual para este tipo de vibración ( $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ ). Además la

mayor intensidad relativa de la banda a  $1575\text{ cm}^{-1}$  del espectro Raman en negro, para las superficie de plata pueden ser explicados en términos de la intensidad del campo EM polarizado paralelo ( $E_{\parallel}$ ) y perpendicular ( $E_{\perp}$ ) a la superficie metálica, ya que entre ellos existe una relación de aproximadamente 1:4 ( $E_{\perp} \approx 4E_{\parallel}$ )<sup>13</sup>. Teniendo en cuenta esto, se establece que la componente de la polarizabilidad del estiramiento C=O se amplifica debido al campo EM  $E_{\parallel}$ . Esto permite predecir que el ácido glucónico está perpendicular a la superficie metálica, por ello esta banda del ácido glucónico aparece con una mayor intensidad, a pesar que la vibración de estiramiento C=O es un modo vibracional Raman es de baja actividad.

Sobre la base de los resultados experimentales y teóricos es posible aseverar que la interacción del ácido glucónico con la superficie de plata ocurre a través de un solo enlace Ag--O; la existencia de una sola banda Ag--O sugiere la formación de un complejo monodentado. La coordinación debería ocurrir entre el átomo de oxígeno del carbonilo y un adatom, es decir un átomo de plata adherido a la nanopartícula. Este resultado permite inferir que existe además de la contribución electromagnética una componente química a la intensificación total del espectro Raman.

Finalmente con los antecedentes antes expuestos podemos afirmar que en este nuevo sustrato, preparado a partir de coloide de plata reducido con glucosa, las partículas metálicas adsorbidas sobre vidrio quedan cubiertas con ácido glucónico unido a la superficie de plata a través del grupo carbonilo. El ensamblador debería orientarse perpendicular a la superficie metálica, garantizando el espacio necesario esperado. En la figura 4.13, se muestra un modelo de la superficie que llamaremos (*Ag-aglu*), donde el ácido glucónico está orientado perpendicular a la superficie generando un recubrimiento aproximado de  $\sim 10\text{ \AA}$  (largo de cada ácido glucónico) o

el doble si es que el ácido glucónico es capaz de formar un doble capa sobre la superficie. Sin embargo, esto es poco probable, ya que las moléculas de ácido glucónico que no se encuentran interactuando con la superficie de plata son fácilmente removidas por el lavado de la superficie.

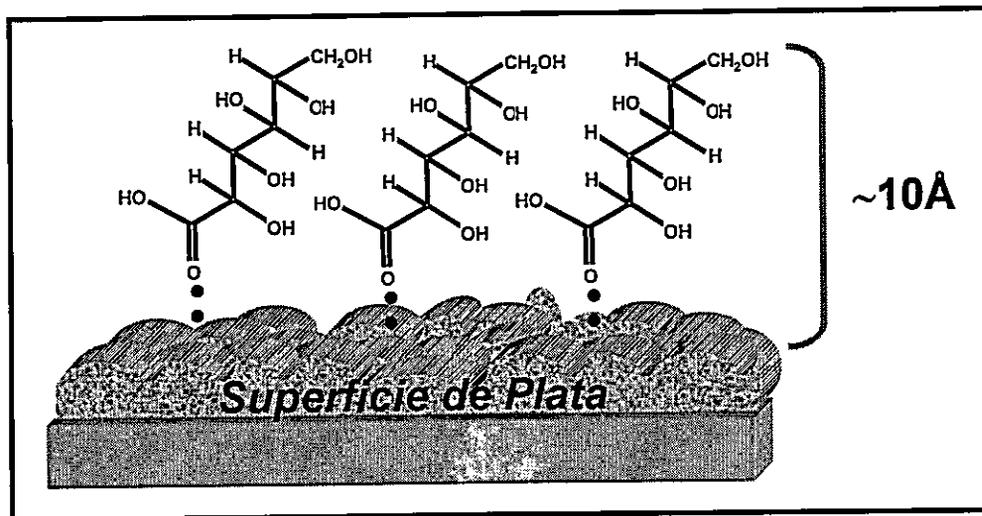


Figura 4.13 Modelo del sustrato de Plata-ácido glucónico (Ag-aglu)

### 4.3 Caracterización UV-visible y AFM de las Superficies de Plata Preparadas a Alto Vacío

La fabricación de superficies de plata evaporada es diferente a la anterior, ya que implica una preparación mecánica, donde la plata en forma de pelets de 99.999% de pureza, es evaporada sobre un vidrio porta objetos al vacío. Por ello se dice que esta superficie de plata esta compuesta exclusivamente de  $Ag^0$ , sin ningún recubrimiento, excepto una pequeña capa de oxido de plata que se produce en forma instantánea al contacto con el aire.

En la figura 4.14 se muestra el espectro de extinción de una película de 5 nm de plata.

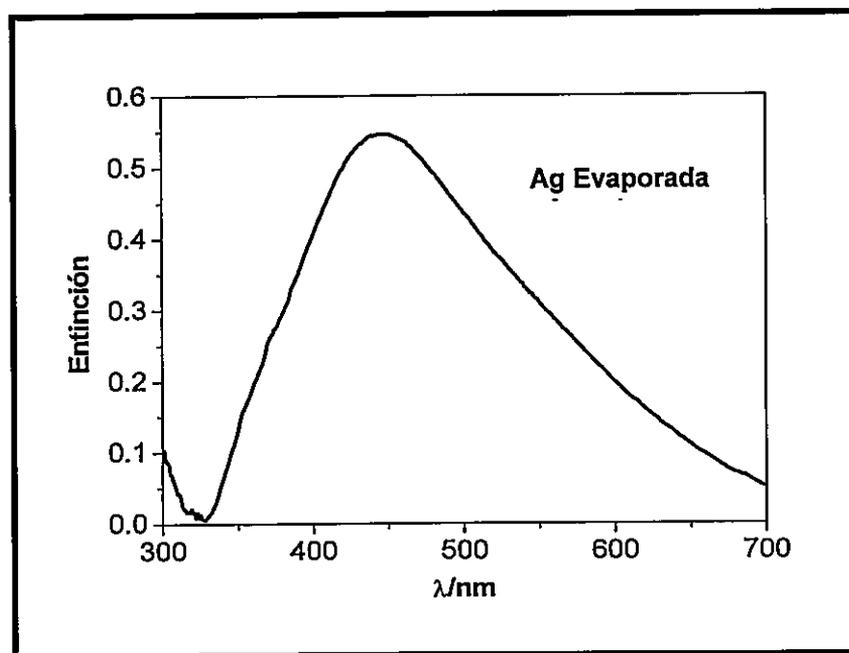
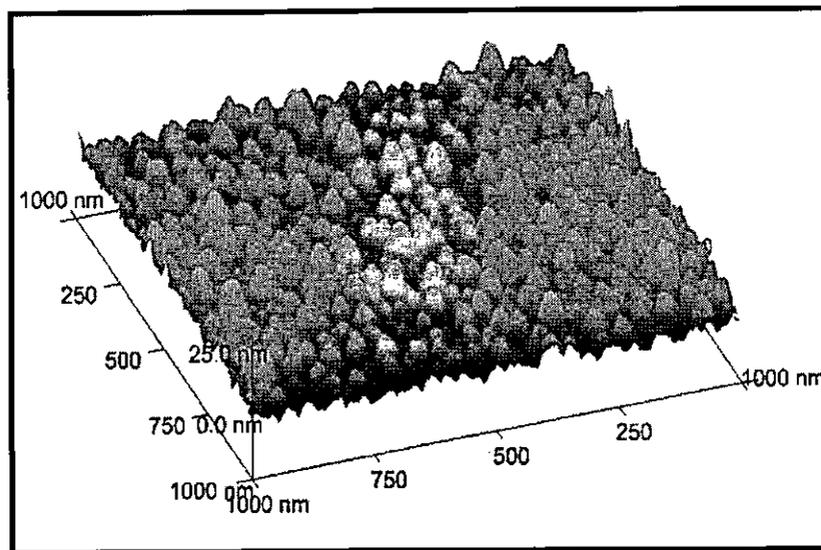


Figura 4.14 Espectro de extinción de una película de 5 nm de plata

En la figura anterior se muestra el espectro de extinción típico para una superficie de plata evaporada, reportado y caracterizado por Aroca y col.<sup>9, 55</sup>. Las principales características son un máximo a 450 nm y un ancho de banda espectral de 200 nm. Este último valor, como analizamos antes, nos da cuenta de la distribución de tamaños, que al parecer es alta y similar a la superficie Ag-aglu. Para corroborar esto se realizó la caracterización de este tipo de superficie a través de microscopia de fuerza atómica. En la figura 4.15 se muestra la AFM para una superficie de plata de 5 nm de espesor.

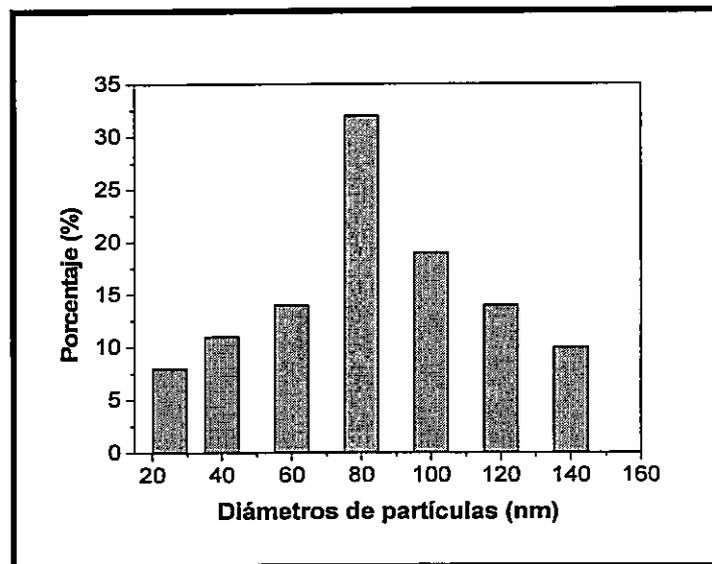


**Figura 4.15** AFM de superficie de plata evaporada

En la figura 4.15 podemos observar que la superficie de plata evaporada está formada por partículas elipsoidales. Además se observa una superficie compuesta por partículas de forma preferentemente elipsoidal y una amplia distribución de tamaños.

### 4.3.1 Estudio estadístico de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata sobre vidrio

Al igual que los resultados anteriores el análisis estadístico de los tamaños de las nanopartículas resume los datos expuestos en la sección 4.3. En la figura 4.17 se muestra la distribución de tamaños para la superficie de plata evaporada, a partir del AFM de la figura 4.16.



**Figura 4.16** Histograma de distribución de tamaños para la superficie evaporada de plata

Al analizar el espectro de extinción de la superficie evaporada de plata, la distribución de tamaños que presenta esta superficie es importante; dimensiones que van desde 30 nm a 140 nm en diámetro y donde los tamaños de partículas encontrados con mayor probabilidad están cercanos a 80nm con una desviación estándar de 50 nm.

## 4.4 Espectros de Extinción Teóricos

La posibilidad que entrega la teoría de Mie de simular espectros de extinción a través de la modificación de los parámetros como el tamaño y la forma de nanopartículas, es una herramienta importante que permite explicar las propiedades ópticas de nanopartículas. En esta sección mostraremos las propiedades ópticas de las formas geométricas encontradas en las superficies metálicas que fueron caracterizadas en las páginas anteriores. Con ello se puede dar cuenta de las posibles propiedades de amplificación de estas superficies.

Algunos autores han modificado las ecuaciones descritas por Mie para formas esféricas generando aproximaciones que permiten describir las propiedades de nanopartículas metálicas de múltiples formas geométricas; esferas, elipsoides, triángulos, cuadrados, etc <sup>15,36</sup>.

En esta última sección del capítulo 4 mostraremos algunos de los espectros que es posible obtener con el programa Mie Plot 3.21 publicado en forma gratuita por P. Plaven <sup>76</sup> para esferas metálicas y los espectros obtenidos con el programa Maple 10, publicado por D. Ross <sup>77</sup>, que permite modelar espectros producidos por nanopartículas metálicas de forma elipsoidal (Las ecuaciones utilizadas por el programa Maple 10, se muestran en forma resumida en el apéndice I).

En las figuras 4.17 y 4.18 se muestran los espectros de la sección geométrica calculada para partículas metálicas esféricas de diámetros 30 nm y 80 nm respectivamente, en aire. Además estos espectros muestran la composición en sus respectivas componentes de absorción y dispersión. Las unidades del eje y son proporcionales al área de una esfera de plata.

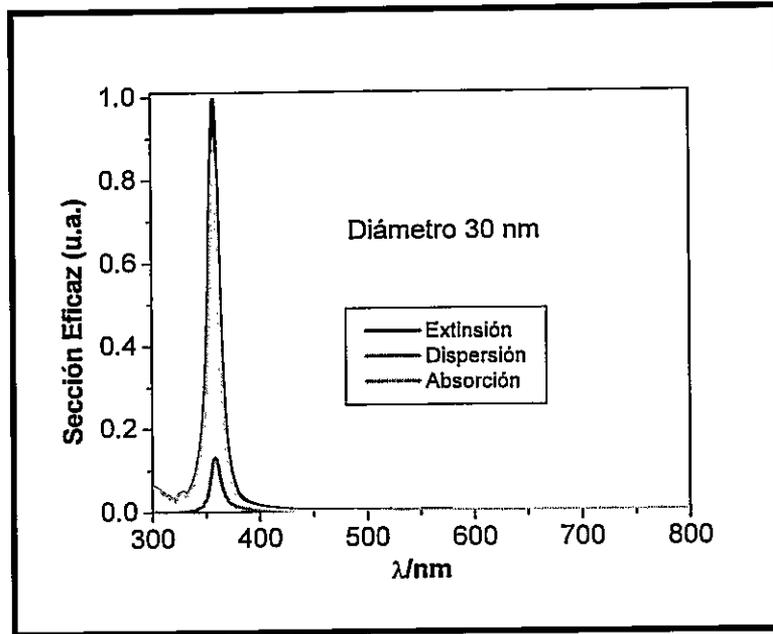


Figura 4.17 Sección eficaz geométrica para una nanopartícula esférica de 30 nm en aire

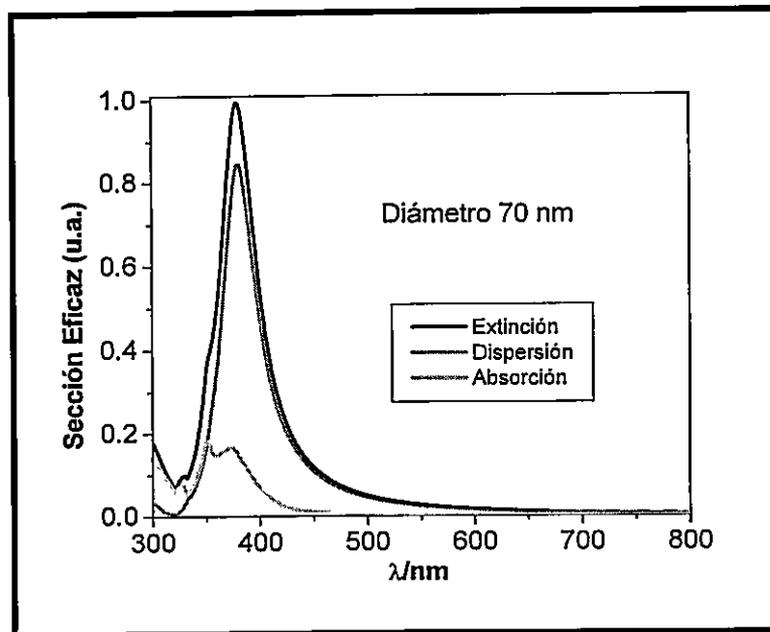
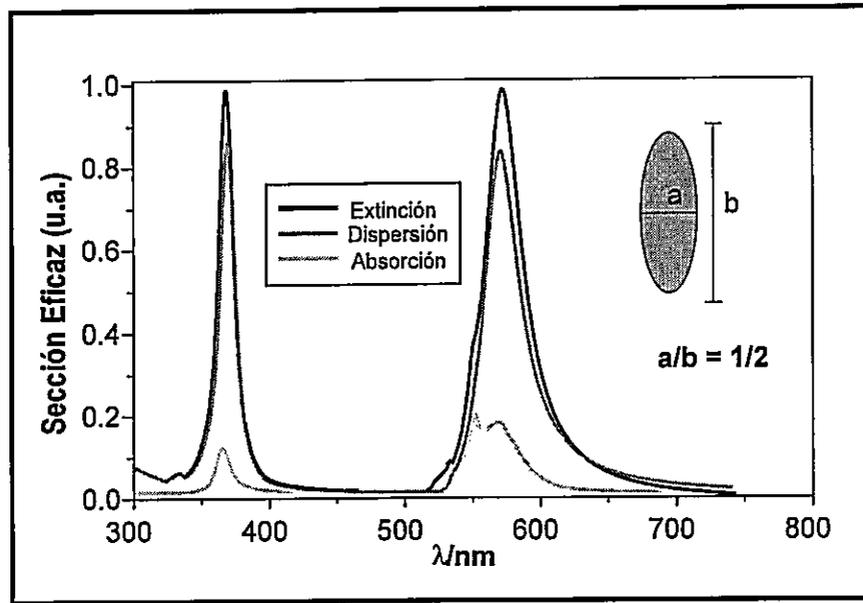


Figura 4.18 Sección eficaz geométrica para una nanopartícula esférica de 80 nm en aire

Al observar las figuras anteriores se puede concluir que el cambio de tamaño de las nanopartículas genera un corrimiento al rojo de 20 nm para un diámetro de 30 nm a 80 nm. Además si se observa en la composición dispersión/absorción de los espectros, el aumento en el tamaño genera un cambio importante en esta proporción, ya que una esfera de 30 nm, muestra que la absorción es mayor a la dispersión, a diferencia de una partícula de 80 nm donde la dispersión es mayor a la absorción. Esto ya ha sido publicado por algunos autores <sup>15, 16, 36</sup> quienes describen como una propiedad natural de nanopartículas metálicas, el hecho que diámetros menores a 40 nm tengan una componente de absorción mayor y partículas de diámetros mayores a 60 nm tengan una componente de dispersión mayor. Esto quiere decir que partículas grandes dispersan luz y partículas pequeñas absorben luz. Esto tendrá, de acuerdo a algunos autores <sup>47, 63</sup>, un efecto sobre la amplificación de señales en fluorescencia.

Por otro lado en la figura 4.19 se muestra el espectro calculado para la sección geométrica de un elipsoide de plata, otra de las formas geométricas encontradas en las caracterizaciones de las soluciones coloidales y superficies metálicas. Las dimensiones de este elipsoide son  $a = 70$  nm (eje corto) y  $b = 140$  nm (eje largo). Además al igual que los espectros anteriores las unidades del eje y son proporcionales al área de un elipsoide de plata.



**Figura 4.19** Sección eficaz geométrica nanopartícula elipsoidal en aire

En figura 4.19 se observa que el espectro que describe esta forma geométrica es totalmente diferente a los descritos para esferas, sobre todo por el hecho que éste presenta dos máximos uno centrado en 370 nm y otro en torno a 580 nm. Esto quiere decir que el plasmón de nanopartículas elipsoidales tiene una doble resonancia que puede ser en 370 nm (eje corto) y 580 nm (eje largo).

## 4.5 Conclusiones

El uso de nanopartículas metálicas en el ámbito de la espectroscopia molecular implica conocer el tipo de nanopartículas con las que se trabaja en estudios de amplificación tanto en su forma como en su tamaño, ya que la suma de estos dos elementos, determina las propiedades ópticas de una superficie metálica. El ejemplo más claro de esto, es el máximo observado entre 600 a 1000 nm en la superficie de Ag-ácido glucónico, debido a su composición de partículas esféricas y elipsoidales de gran tamaño (100-300 nm de diámetro).

En este sentido la información cualitativa que es posible extraer de los espectros de extinción de las soluciones coloidales y de las superficies metálicas, junto con los resultados que proporcionan las caracterizaciones con microscopías electrónicas (SEM), AFM y la modelación de espectros a través de la teoría de Mie, son fundamentales para la comprensión de la información que entregan los espectros de extinción.

Por otra parte, la técnica de microscopía Raman, permitió caracterizar la superficie de Ag-ácido glucónico y comprobar que las nanopartículas metálicas tenían un recubrimiento con moléculas derivadas de la oxidación de la glucosa. Esto tiene importancia en estudios de fluorescencia amplificada por superficie, dado que este recubrimiento actúa como espaciador entre el metal y las moléculas.

**CAPÍTULO 5**  
**FLUORESCENCIA DE RODAMINA-B**  
**AMPLIFICADA POR SUPERFICIE DE**  
**PLATA-ÁCIDO GLUCÓNICO.**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*La razón siempre ha existido, pero no siempre en una forma razonable.*

**Karl Marx (1818-1883) Filósofo y economista alemán.**

En este capítulo se muestran los resultados de la amplificación de la señal de fluorescencia de Rodamina-B cuya fórmula estructural se muestra en la figura 3.1 del capítulo 3. Con este sistema molecular se estudia el comportamiento de una superficie metálica preparada a partir del coloide de Ag reducido por D-glucosa.

Como se ha descrito en el capítulo 2, para poder observar el efecto producido por las nanopartículas metálicas en la fluorescencia, es necesario separar el fluoróforo de la superficie y así evitar o atenuar el efecto de apagamiento producido por el proceso de transferencia de energía que compite con la fluorescencia.

En la literatura se describen diferentes formas de obtener la separación metal-molécula. Para poder observar la amplificación de la emisión fluorescente, los espaciadores más utilizados son películas delgadas constituidas principalmente por ácidos grasos <sup>9</sup>, SiO<sub>2</sub> <sup>22,25</sup> y polímeros transparentes <sup>6</sup>.

En la presente tesis el problema de la separación ha sido resuelto preparando una superficie metálica con una metodología que permite generar un recubrimiento de las nanopartículas con una capa de moléculas, la que actúa como elemento separador entre el fluoróforo y el metal depositado sobre vidrio.

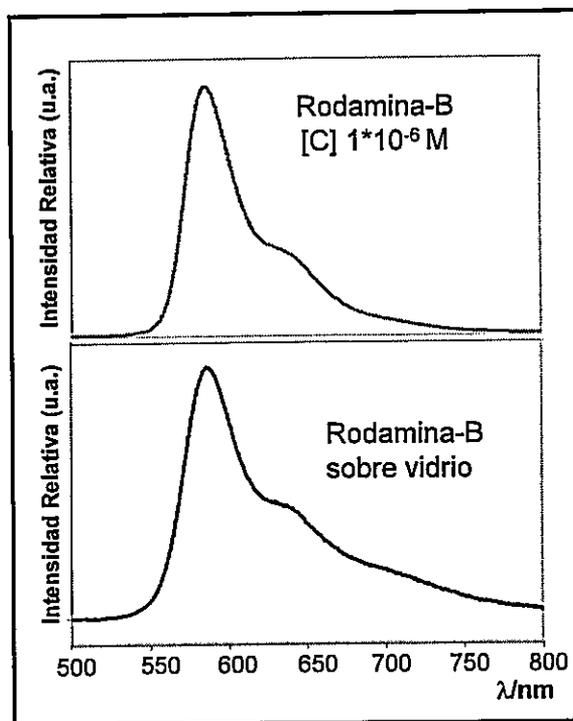
La metodología de preparación de la solución coloidal de plata y de las superficies fue previamente descrita en el capítulo 3 sección 3.2.1.

## 5.1 Fluorescencia Amplificada por Superficie de Rodamina-B

Con el objeto de determinar la efectividad de nuestro sustrato de plata reducido por glucosa en espectroscopía de fluorescencia amplificada por superficie, se realizó un estudio con un sistema molecular estándar como Rodamina-B, ya que este ha sido utilizado para otros estudios de SEF, permitiendo comparar nuestros resultados de amplificación con los informados en la literatura.

La característica de Rodamina-B es la de tener un rendimiento cuántico de 0.95 en solución acuosa, dato reportado por Kubin y col, en 1982 <sup>78</sup>. Nuestro estudio se realiza en estado sólido, donde también se han reportado valores de rendimiento de emisión. Kawasaki y col. demuestran que, en sólido Rodamina-B tiende a formar asociaciones que apagan la fluorescencia, cambiando su rendimiento de emisión a  $\sim 0.80$  <sup>19</sup>.

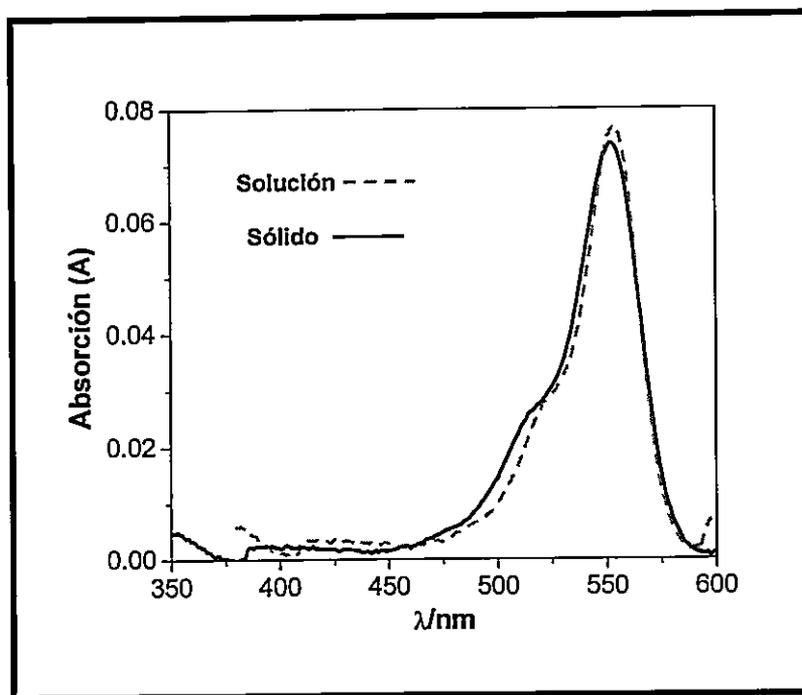
Para descartar la presencia de la formación de asociados en estado sólido, se compara un espectro de emisión de una solución diluida de Rodamina-B ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) con el espectro de emisión de Rodamina-B sobre vidrio en estado sólido. La muestra en estado sólido fue preparada depositando 15  $\mu\text{l}$  de una solución  $1.5 \times 10^{-6} \text{M}$  sobre vidrio, la que cubre un área aproximada de  $1 \text{cm}^2$ .



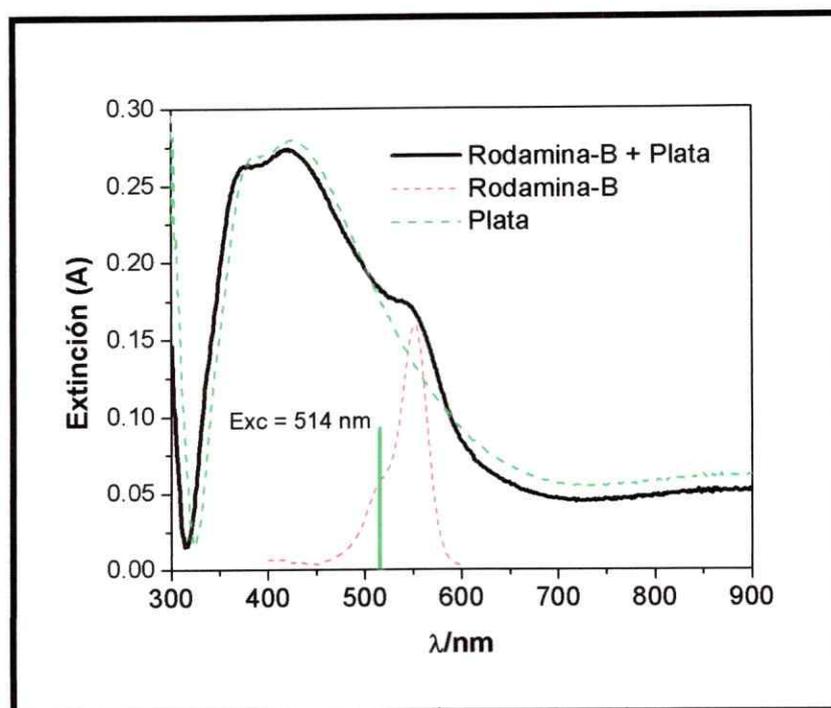
**Figura 5.1** Espectro de emisión de Rodamina-B en solución y sobre vidrio

En la figura 5.1, se observa que ambos espectros de fluorescencia, en solución y en estado sólido no presentan cambios y ambos presentan dos bandas, una centrada a 580 nm y otra a 640 nm. Dada la alta semejanza que presentan ambos espectros, nos permite descartar la formación de especies asociadas intramoleculares en estado sólido.

En la figura 5.2 se muestra el espectro UV-visible en solución y en vidrio. En esta figura se observa que el espectro de absorción en estado sólido no presenta cambios con respecto al espectro en solución. En ambos se observa una banda de absorción a 550 nm y un leve hombro a 520 nm. Este resultado concuerda con los estudios en estado sólido de este sistema molecular publicados recientemente <sup>10, 19, 79,</sup>

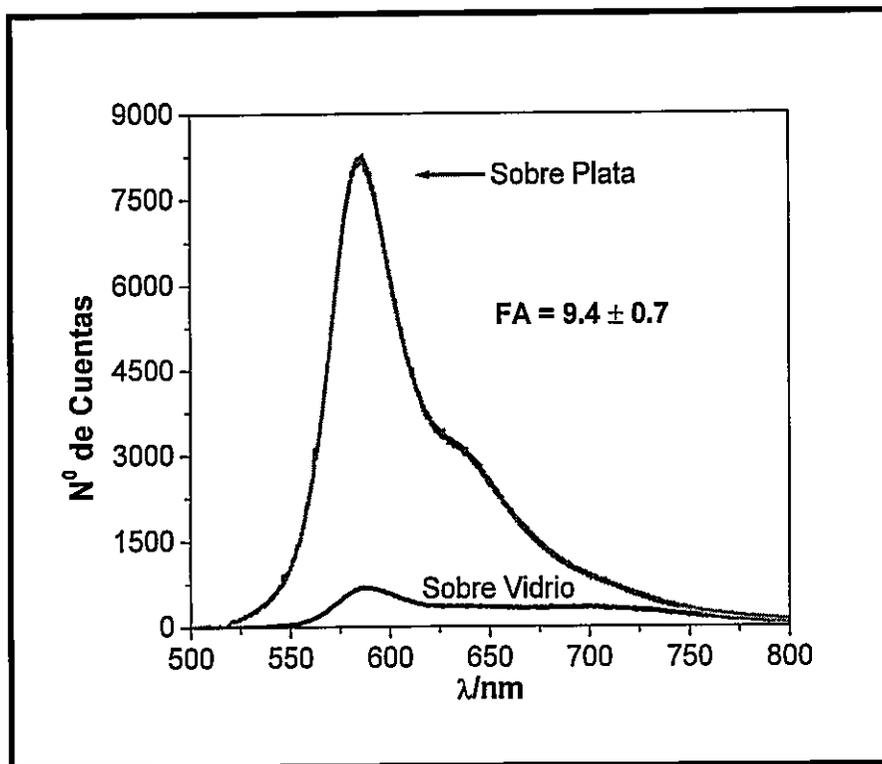


**Figura 5.2** Espectro de absorción en solución y en estado sólido de Rodamina-B



**Figura 5.3** Espectros de absorción de Rodamina-B sobre vidrio y sobre plata-ácido glucónico

En la figura 5.3 se presenta los espectros de absorción para Rodamina-B sobre vidrio y sobre la superficie de plata-ácido glucónico. En relación a esta figura es posible observar que en el espectro de extinción de la superficie de plata, la presencia del soluto se expresa a través de la inflexión a 550 nm, característico de la banda de absorción de Rodamina-B, que se muestra en la misma la figura 5.3 con línea discontinua. Además, con este espectro es posible constatar que la absorción de la molécula esta en resonancia con el plasmón del metal y la frecuencia de excitación (514 nm) que se muestra en la figura con la línea de verde.

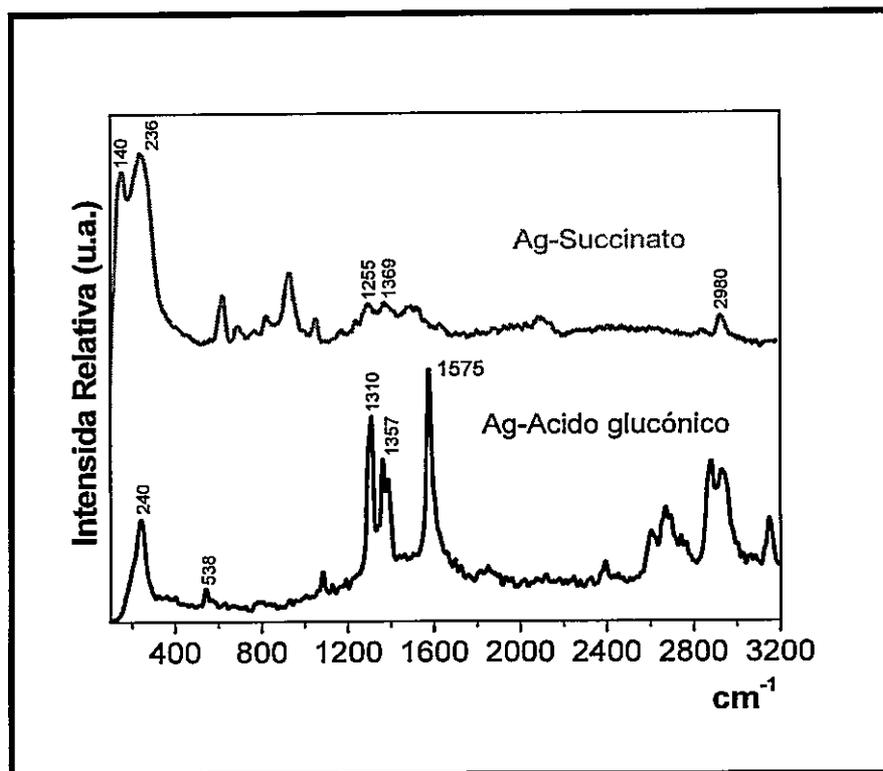


**Figura 5.4** Espectro de fluorescencia de Rodamina-B en vidrio y sobre el sustrato de plata-ácido glucónico

En la figura 5.4 se muestra el espectro de fluorescencia de Rodamina-B sobre el sustrato de plata-ácido glucónico y el espectro de fluorescencia sobre vidrio. En esta figura es posible observar que, la fluorescencia de Rodamina-B aumenta su intensidad en  $9.4 \pm 0.7$  veces.

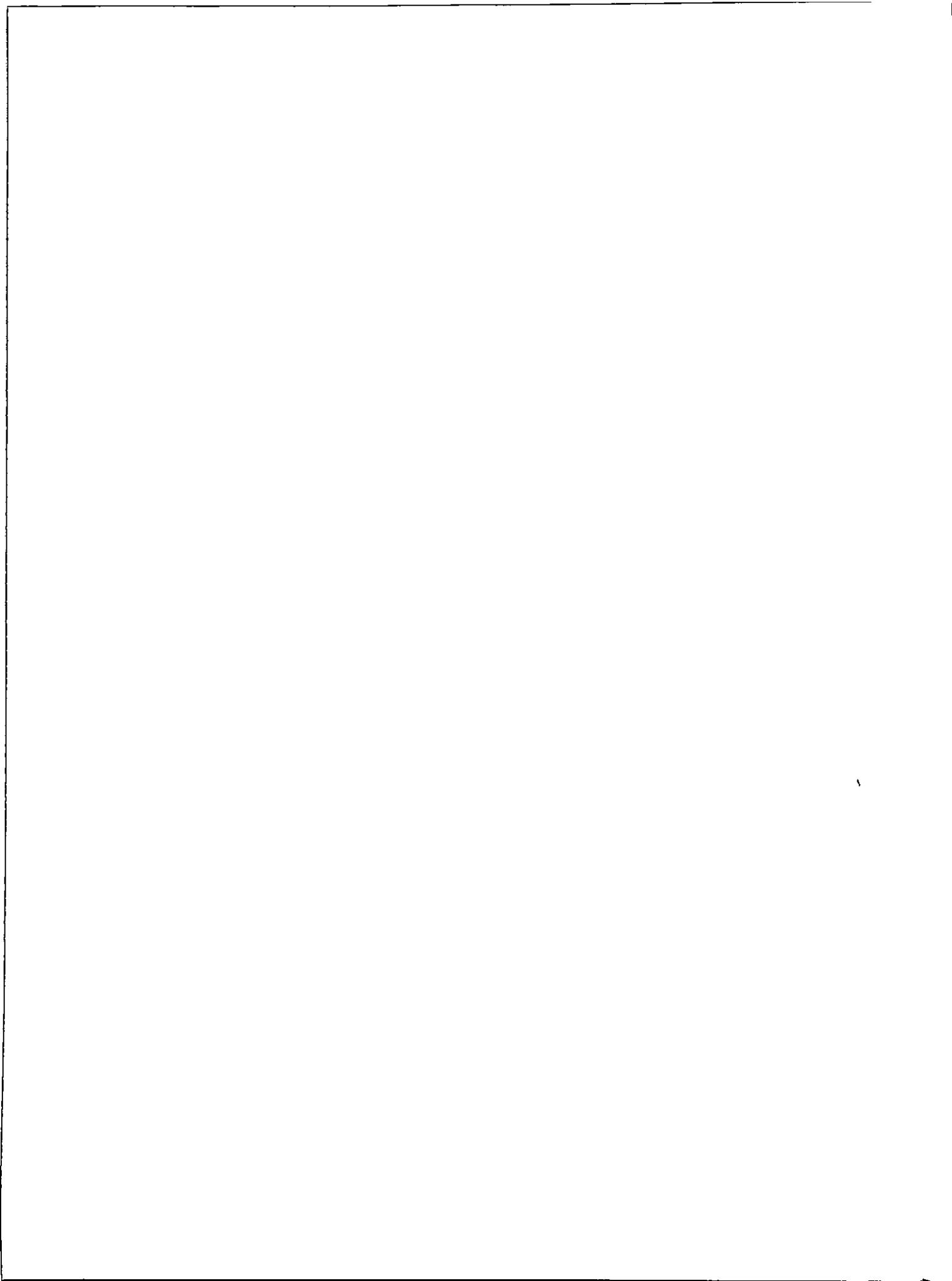
La eficiencia de la superficie de plata-ácido glucónico es ahora comparada con otro sustrato obtenido en similares condiciones; para ello se buscó un coloide que tuviera nanopartículas metálicas de formas y tamaños similares a los encontrados para el coloide de plata obtenido por la oxidación de glucosa, siendo el coloide de citrato, el que cumple con estos requisitos.

Antecedentes del coloide de citrato y superficies preparadas con él han sido reportados por Doering y col. <sup>81</sup>, Lu y col. <sup>82</sup> y Maxwell y col. <sup>83</sup>, donde tanto el coloide como su superficie fueron utilizados en espectroscopía Raman y Raman Resonante Amplificado por Superficie (SERS y SERRS). La reacción redox que involucra esta coloide implica reducir la plata en medio acuoso con citrato trisódico, para generar plata metálica más succinato disódico y dióxido de carbono como productos de la reacción, de acuerdo a los trabajos publicados por Doering y col. <sup>81</sup> y Maxwell y col. <sup>83</sup>. En este sentido se espera que las partículas metálicas formadas queden recubiertas con residuos provenientes del proceso de reducción. Para corroborar esta afirmación, la superficie fue caracterizada a través de espectroscopía Raman de la superficie de plata-succinato, la que es comparada con el espectro SERS obtenido para la superficie de plata-ácido glucónico (ver figura 5.6).

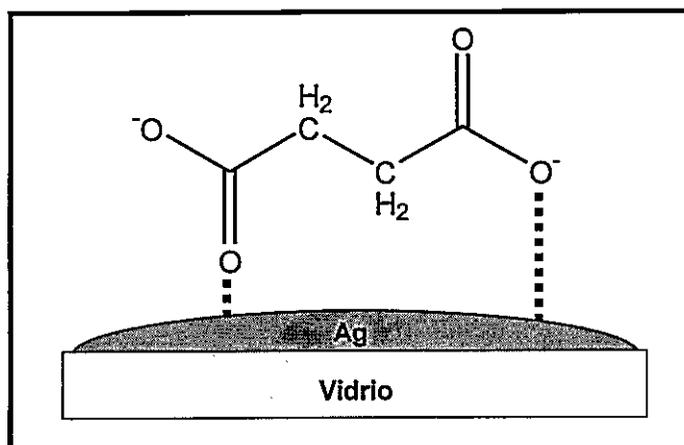


**Figura 5.5** Espectro Raman (SERS) del sustrato de Ag-citrato y del sustrato Ag-aglu

En la figura 5.6, las bandas observadas a  $140\text{ cm}^{-1}$  y  $236\text{ cm}^{-1}$  en la superficie de plata succinato son asignables a la interacción plata oxígeno ( $\text{Ag}\text{---}\text{O}$ ). En el caso de la superficie de plata-ácido glucónico aparece una sola banda a  $240\text{ cm}^{-1}$ . Esto nos hace pensar que el succinato interactúa con la superficie de plata a través de los grupos acetato. Además el que en el espectro de plata-succinato aparezcan dos bandas podría indicar que son los dos grupos acetato de la molécula los que interactúan con la superficie de plata. De acuerdo a los antecedentes descritos en las páginas 82 a 85, el que no aparezca una banda en torno a  $1575\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}\text{---}\text{Ag}$ ) nos indica que la orientación del succinato sobre la superficie de plata es en forma paralela, tal como se muestra en la figura 5.7. De acuerdo a esta figura, el succinato



puede generar un recubrimiento de las superficies metálicas, donde el valor mínimo de este recubrimiento puede ser de 4 Å ó 5 Å que corresponde al ancho de la molécula de succinato orientada paralelamente a la superficie de plata.

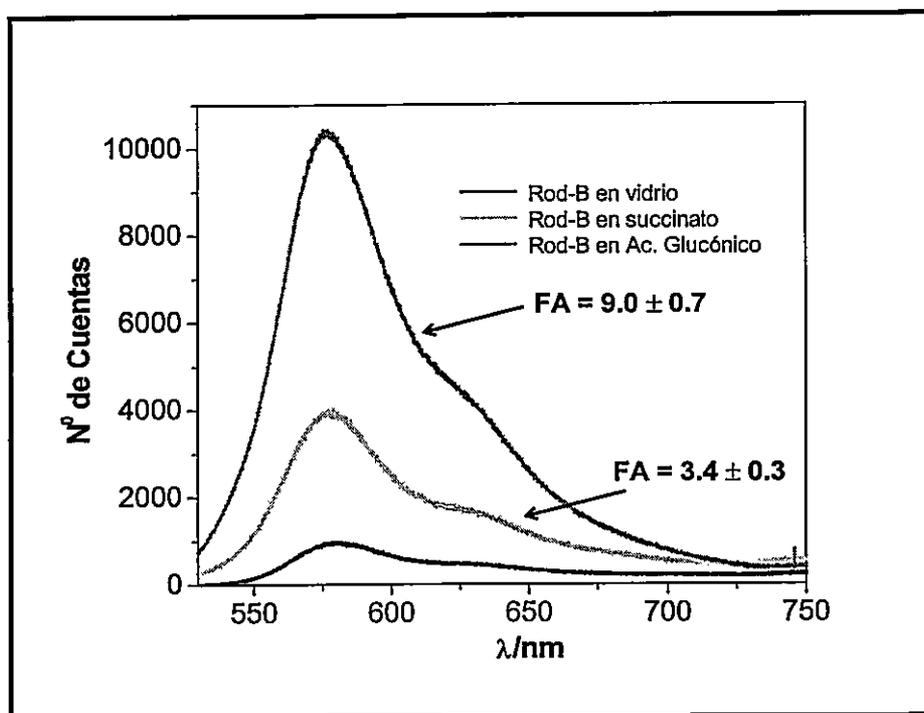


**Figura 5.6 Modelo para la interacción de succinato con plata sobre vidrio**

El estudio que permite comparar el efecto de ambas superficies, Ag-succinato y Ag-ácido glucónico, en la fluorescencia de Rodamina-B se presenta en la figura 5.8. En ambos casos la muestra fue preparada depositando 5 ul de Rodamina-B en solución de etanol  $1.5 \times 10^{-6}$  M. En esta figura se observa claramente que bajo idénticas condiciones experimentales, el sustrato de plata-ácido glucónico amplifica la señal fluorescente de Rodamina-B en un factor de 2 veces mayor, respecto de la amplificación obtenida empleando el sustrato de plata-succinato.

Lo anterior puede ser explicado por el recubrimiento que tienen las dos superficies metálicas. Por un lado, el succinato recubre la superficie de plata generando un espaciado de aproximadamente 4-5 Å, mientras que para la superficie de plata-ácido glucónico presenta un valor aproximado de 10 Å, valor que es 2 a 3

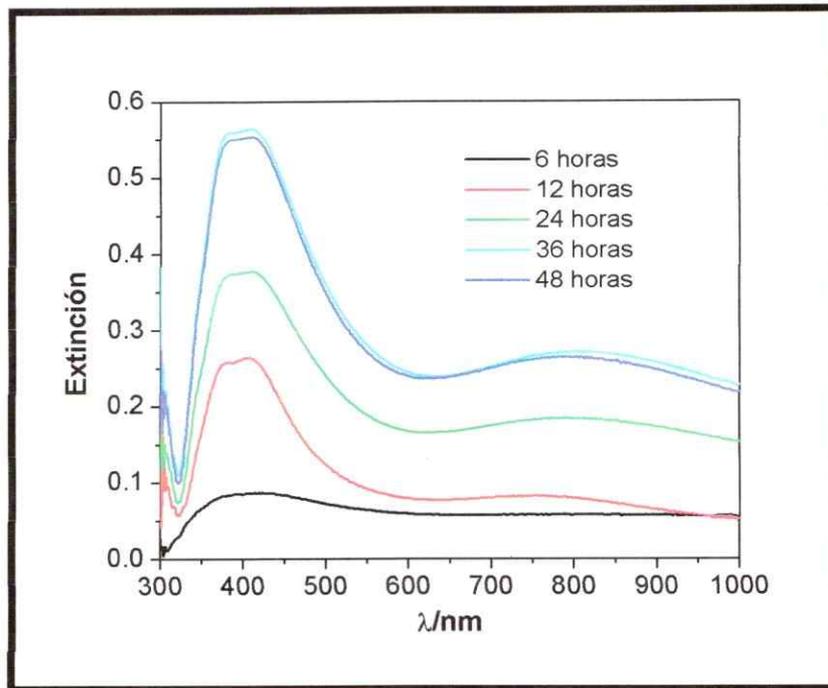
veces mayor. Por lo tanto una mayor separación entre las moléculas depositadas y la superficie de plata-ácido glucónico permite una mayor amplificación de la señal fluorescente, ya que las moléculas de Rodamina-B estarán en promedio 2 veces más lejos de la superficie, minimizando la transferencia de energía molécula-metal que apaga la fluorescencia.



**Figura 5.7** Espectros de fluorescencia de Rodamina-B depositada sobre diferentes tipos de superficies metálicas.

### **5.1.1 Tiempo de depósito de nanopartículas sobre vidrio**

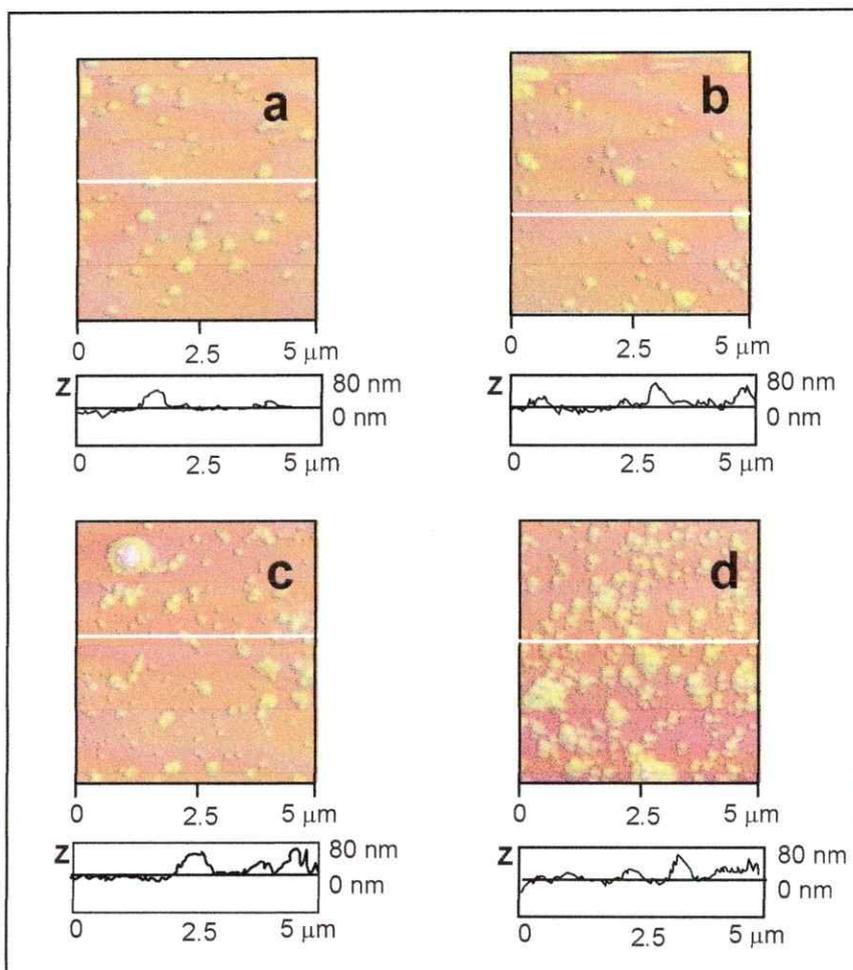
Con el objeto de optimizar la superficie de ácido glucónico para mejorar el efecto de amplificación de la señal fluorescente de Rodamina-B y de las moléculas consideradas en esta tesis, se muestra el efecto de modificar la morfología de la superficie de plata-ácido glucónico sumergiendo el vidrio funcionalizado en la solución coloidal durante diferentes períodos de tiempo. En la figura 5.9, se muestra los espectros de extinción de las superficies obtenidas con 6, 12, 24, 36 y 48 horas de depósitos del coloide sobre vidrio funcionalizado. Tal como se observa en la figura 5.9, a medida que aumenta el tiempo de inmersión en el coloide, mayor es la cantidad de plata depositada, hecho que se expresa en el mayor valor en la extinción en torno a 400 nm y en la banda entre 620 y 1000 nm. Además, después de 36 horas se encuentra que la cantidad de plata depositada alcanza la saturación. El aumento en la extinción puede deberse no solo a la mayor cantidad de plata depositada, sino que además a una diferente manera de agruparse en torno a diferentes centros de nucleación de plata metálica; así lo sugiere la presencia de la nueva banda que aparece cerca de 800 nm.



**Figura 5.8** Efecto del tiempo de depósito del coloide sobre vidrio funcionalizado

Por otra parte en la figura 5.10 se muestra las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) de las superficies obtenidas a diferentes tiempos de inmersión en el coloide. En esta figura se observa que a medida que aumenta el depósito de plata, también aumentan el tamaño de las nanopartículas sobre vidrio. En esta misma figura se muestra un gráfico del perfil en el eje z, perpendicular a la superficie, plano x,y. Este perfil determina la elevación en el eje z, mostrando las irregularidades topográficas de la superficie. La línea de color blanco en las imágenes corresponde al perfil que se muestra en la parte inferior de cada una de las figuras. Además como se observa en cada uno de los AFM a medida que aumenta el tiempo de inmersión en el

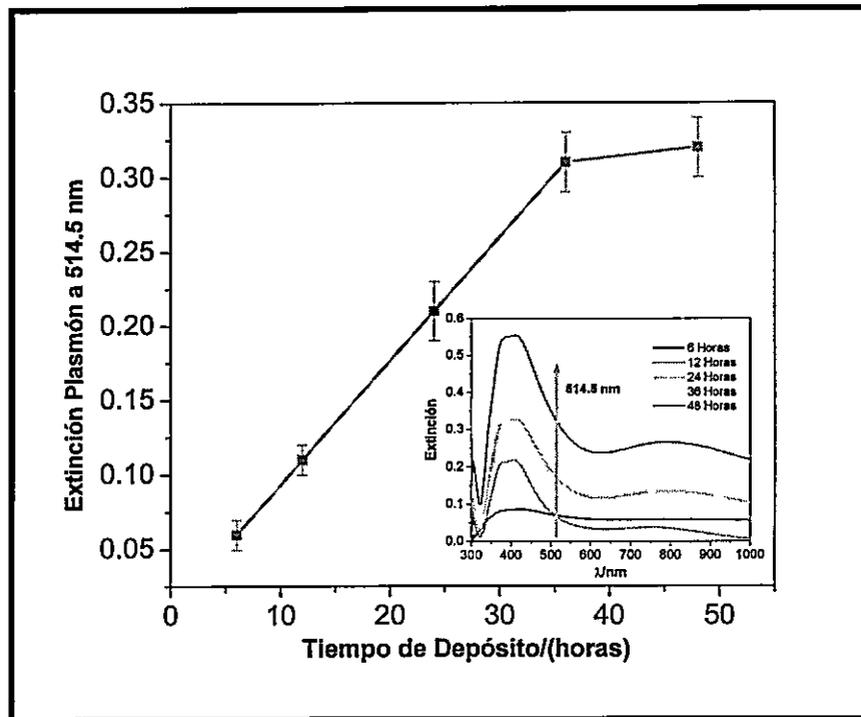
coloide, aumenta la cantidad de plata depositada y el tamaño de las nanopartículas sobre el vidrio funcionalizado, esto modifica las superficie de plata-ácido glucónico.



**Figura 5.9** Microscopía de fuerza atómica (AFM) de superficie de Ag-aglu a 6 horas (a), 12 horas (b), 24 horas y 36 horas

Una forma de cuantificar la cantidad de nanopartículas depositadas es medir el aumento de la extinción de cada una de las superficies. Dado que la línea de excitación es de 514.5 nm, podemos medir el cambio en la extinción del plasmón a esta longitud de onda. En la figura 5.11 se muestra el aumento en la extinción en

función del tiempo de depósito. En esta figura se observa que al aumentar el tiempo de depósito de nanopartículas sobre vidrio aumenta la extinción en el valor de la longitud de onda de excitación, alcanzando la saturación después de las 36 horas.



**Figura 5. 10 Aumento de la extinción a 514.5 nm en función del tiempo de depósito de nanopartículas de plata-ácido glucónico**

Dado que el mayor tiempo de depósito de nanopartículas modifica la superficie de plata-ácido glucónico, como lo muestran las microscopias de fuerza atómica (AFM) de la figura 5.10, se espera que esto tenga un efecto en la amplificación de la fluorescencia. Para comprobar esto se agregó 5 ul de solución en etanol  $1.5 \times 10^{-6}$  M de Rodamina-B. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 5.12. Además en la figura 5.13 se muestra la relación entre el factor de amplificación y el tiempo de depósito de nanopartículas sobre vidrio.

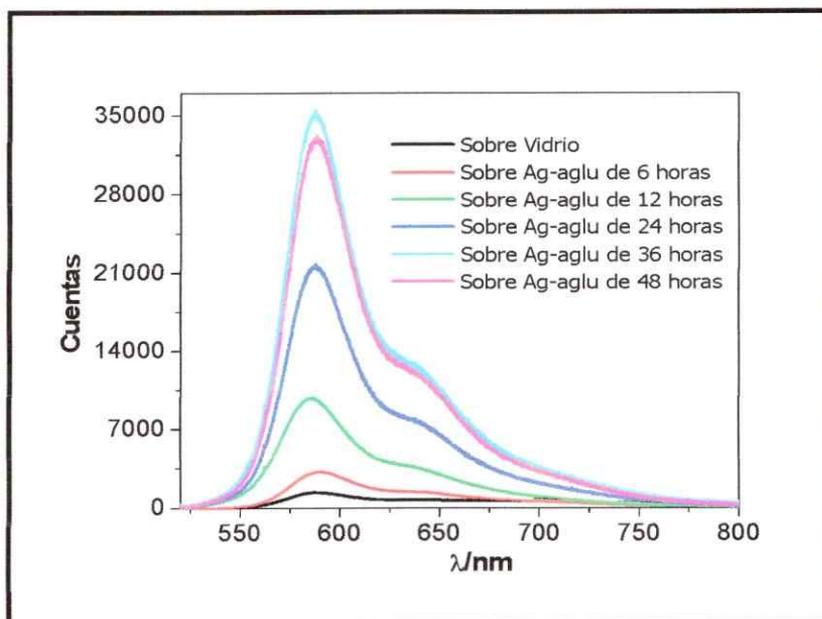


Figura 5.11 Espectros de fluorescencia de Rodamina-B sobre superficie de plata-ácido glucónico obtenida a diferentes tiempos de depósito

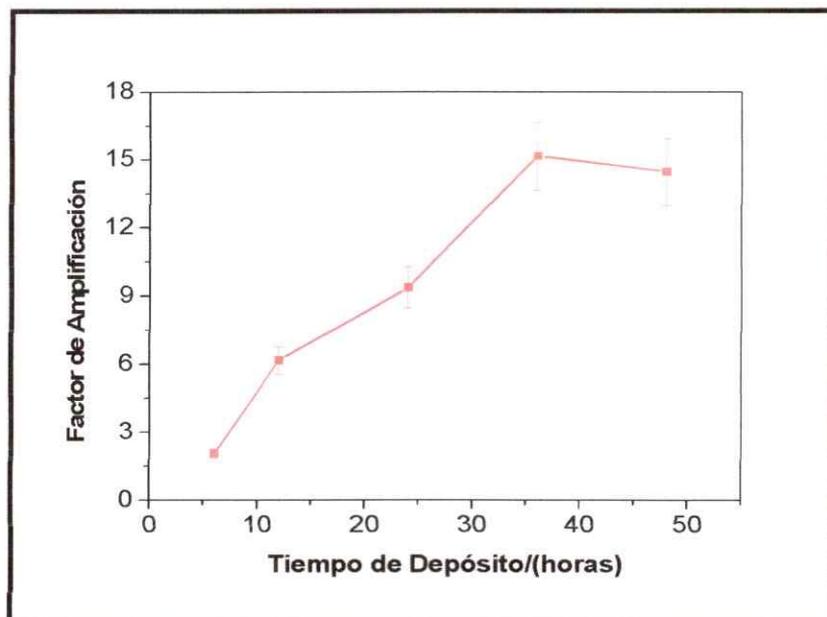


Figura 5.12 Factor de amplificación en función de tiempo de depósito de nanopartículas sobre vidrio.

Como se observa en la figura 5.12 y 5.13 el aumento en el depósito de nanopartículas de plata sobre vidrio, que se expresa en una mayor extinción, tiene un efecto significativo en la amplificación de la fluorescencia para Rodamina-B, llegando a un valor máximo de 15 veces. Este valor de amplificación esta dentro de los ordenes de magnitud reportados por otros autores <sup>19, 79</sup> en estudios de amplificación para Rodamina-B en estado solidó, donde se lograron amplificaciones entre 15 a 60 veces en superficies de plata y oro.

Además, la modificación de la superficie debido a la mayor concentración de nanopartículas sobre vidrio y su efecto en la amplificación fluorescencia es un antecedente atractivo, ya que usualmente el cambio de la distancia metal-molécula es reportado como modificador de la amplificación. En este sentido algunos autores han obtenido resultados similares al nuestro, reportando que un mayor cantidad de nanopartículas sobre vidrio, genera una mayor amplificación de la fluorescencia <sup>63, 84</sup>.

## 5.1.2 Cinética de desactivación del primer estado excitado electrónico de Rodamina-B

Para cada una de estas muestras se realizó un estudio cinético midiendo los tiempos de vida de la fluorescencia a través de la técnica de corrimiento de fase y modulación en función de la frecuencia, esto con el objetivo de establecer una relación entre la cinética de desactivación del estado excitado y la amplificación de la fluorescencia. Los tiempos de vida fueron obtenidos con la línea de excitación 514.5 nm (Láser Ion-Argon) y la emisión fue observada a 580 nm, los resultados se muestran en la tabla 5.1.

**Tabla 5.1 Tiempos de vida para Rodamina-B**

Rodamina-B	Tiempo de vida $\tau$ (nseg)	$\chi^2_{red}$	Factor de Amplificación (FA)
Solución (Etanol)	$2.80 \pm 0.18$	1.2	-----
Sobre Vidrio	$3.52 \pm 0.19$	2.0	-----
Sobre Plata-Aglu (6 horas)	$2.69 \pm 0.10$	1.8	$3.1 \pm 0.2$
Sobre Plata-Aglu (12 horas)	$2.62 \pm 0.11$	2.6	$6.2 \pm 0.6$
Sobre Plata-Aglu (36 horas)	$2.78 \pm 0.12$	2.3	$15.1 \pm 1.5$

donde  $\tau$  corresponde al tiempo de vida para una componente (mono-exponencial) (1<sup>er</sup> columna),  $\chi^2_{red}$  es el valor estadístico del error asociado a la medida (2<sup>da</sup> columna) y en la 3<sup>er</sup> columna se muestra la amplificación de la fluorescencia.

Los tiempos de vida obtenidos con esta técnica fueron comparados con los publicados por Del Monte y col <sup>85</sup> en el año 1998, para Rodamina-B; En agua  $\tau=2.38 \pm 0.15$  nseg y sobre cuarzo  $\tau=3.58 \pm 0.29$  nseg, valores que están en concordancia con los presentados en este trabajo. Además si analizamos la tabla 5.1 observamos que el tiempo de vida ( $\tau$ ) en sólido tiene un leve aumento con respecto a

la solución, hecho que es reportado por algunos autores para tiempos de vida del primer estado excitado de moléculas en estado sólido<sup>26, 80, 85, 86</sup>.

Por otra parte los valores de  $\tau$  no muestran dependencia con la cantidad de plata depositada sobre vidrio, observándose que sobre la superficie metálica muestran una disminución con respecto al valor sobre vidrio de aproximadamente 0.82 nseg; sin embargo, en cada una de las superficies se observa una amplificación creciente de la emisión. Esto es un resultado esperado, ya que la modificación de los procesos cinéticos del fluoróforo debido a la transferencia de energía metal-molécula, solo cambia el tiempo de vida, cuando varía la distancia metal-molécula. En este sentido la superficie de plata-ácido glucónico tiene un recubrimiento que no cambia si se deposita una mayor cantidad de plata. Por lo tanto las moléculas de Rodamina-B sobre esta superficie quedarán en promedio a la misma distancia, independientemente de la mayor cantidad de plata depositada. En consecuencia es posible inferir que el aumento progresivo de la amplificación de la emisión de Rodamina-B se debe a un mayor depósito de nanopartículas metálicas y no a una modificación de los procesos cinéticos de desactivación del primer estado excitado.

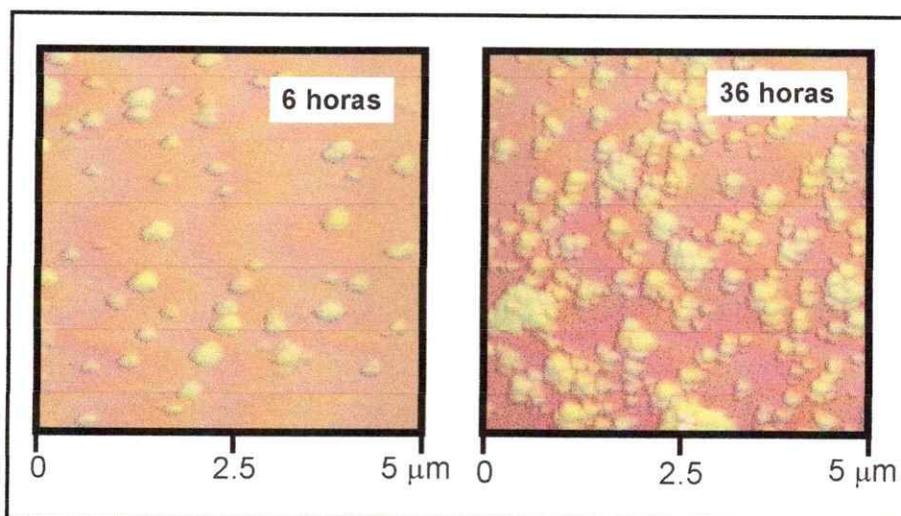
En este sentido y dado que el aumento en la intensidad de la señal de un fluoróforo ubicado a la distancia  $d$  de una estructura metálica puede ser determinada a partir del nuevo campo electromagnético amplificado por la superficie metálica, el Factor de Amplificación (FA) de la señal fluorescente en un experimento SEF puede ser descrito por el término  $FA(\omega_{ex}, \omega_{em})$ , que corresponde a la razón de la intensidad de fluorescencia del sistema molecular medida en presencia de una superficie metálica, relativa a la intensidad de fluorescencia de la misma muestra en una superficie sin metal e irradiada con igual intensidad de radiación. El FA, también

denominados por algunos autores como **Rendimiento cuántico aparente**<sup>10, 23, 27</sup> se define de acuerdo a la siguiente ecuación

$$FA(\omega_{ex}, \omega_{em}) = |E(\omega_{ex})|^2 |Em(\omega_{em})| \quad (5.1)$$

donde  $\omega_{ex}$ , y  $\omega_{em}$ , corresponden a las frecuencias de excitación y emisión, respectivamente. Esta ecuación muestra que la magnitud del aumento de la señal depende del aumento del campo electromagnético  $|E(\omega_{ex})|^2$  y de la cinética de desactivación del estado excitado  $|Em(\omega_{em})|$ .

La amplificación de campo eléctrico, contenida en el término  $|E(\omega_{ex})|^2$ , que corresponde a la intensidad del campo eléctrico amplificado por la superficie nanoestructurada en el sitio donde se encuentra la molécula. Este factor depende de la naturaleza de la superficie, la que se modifica aumentando el tamaño de las nanopartículas. En nuestro caso el aumento del tamaño se constata con las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) mostrados en la figura 5.11. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 5.14 donde se observan dos imágenes de AFM para una superficie de 6 horas de depósito, donde los tamaños de las partículas metálicas se encuentran entre 70 nm y 150 nm de diámetro, mientras que para una superficie de 36 horas estos valores aumentan entre 100 nm y 500 nm de diámetro.



**Figura 5.13 Aumento de tamaño de las nanopartículas de plata depositadas sobre vidrio funcionalizado**

Por otro parte la magnitud del segundo término  $|Em(\omega_{em})|$  es proporcional a  $1/Q$ , donde  $Q$  es el rendimiento cuántico de la molécula. Así moléculas de alto rendimiento cuántico no generaran altos valores de amplificación de la señal de fluorescencia<sup>10, 27</sup>.

Se ha llegado a proponer que el aumento de la fluorescencia por efecto de superficies metálicas es inversamente proporcional al rendimiento de emisión molecular; por ello independientemente del aumento del campo electromagnético definido por el término  $|E(\omega_{ex})|^2$ , la amplificación de la fluorescencia está limitada por el rendimiento de emisión de la molécula. Por ello para determinar si el factor de amplificación es inversamente proporcional a  $Q$  se calculó el rendimiento de emisión de Rodamina-B en nuestras muestras, considerando las ecuaciones de tiempo de vida natural ( $\tau_N$ ), tiempo de vida ( $\tau$ ) y rendimiento de emisión ( $Q$ ).

$$\tau_N = \frac{1}{\Gamma} \rightarrow \Gamma = \frac{1}{\tau_N} \quad (5.1)$$

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \rightarrow (\Gamma + k_{nr}) = \frac{1}{\tau} \quad (5.2)$$

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (5.3)$$

si sustituimos las ecuaciones 5.1 y 5.2 en 5.3, el rendimiento cuántico queda en función de los tiempos de vida, ecuación 5.4.

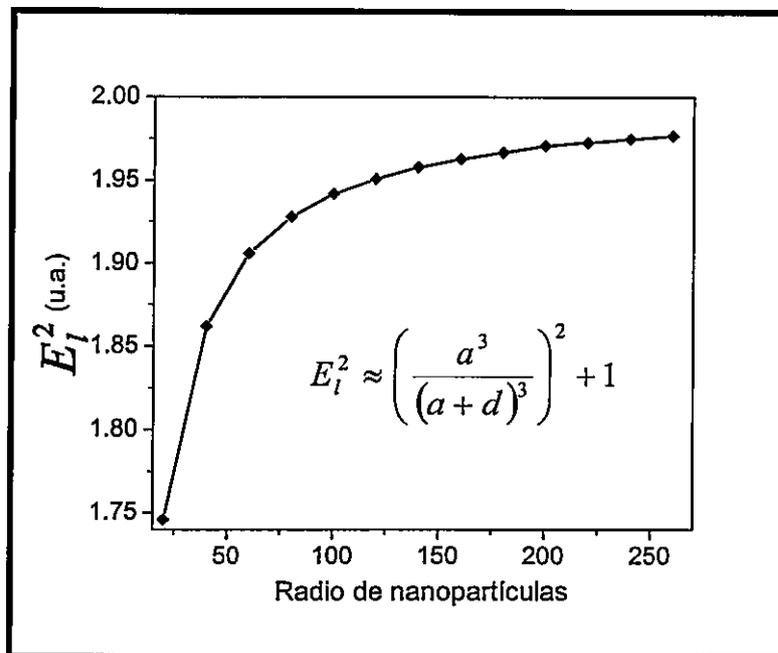
$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \rightarrow Q = \frac{1}{\tau_N} * \tau \quad (5.4)$$

El tiempo de vida ( $\tau$ ) obtenido sobre vidrio es de  $3.52 \pm 0.19$  nseg y a través de la metodología propuesta por Strickler y Berg en 1962<sup>87</sup> el tiempo de vida natural ( $\tau_N$ ) que considera solo la desactivación radiativa es de  $3.98 \pm 0.28$  nseg. Sustituyendo estos valores en la ecuación 5.4 es posible estimar que el rendimiento cuántico de emisión para Rodamina-B es de  $0.88 \pm 0.06$  y el inverso de este valor es 1.14, valor muy inferior a la amplificación de 15 veces obtenida para Rodamina-B con la superficie de plata de un depósito de 36 horas. Por lo tanto, si el factor asociado al rendimiento de emisión no da cuenta de la amplificación de 15 veces para Rodamina-B, podemos decir que el aumento del campo electromagnético local que percibe la molécula debido al mayor depósito de nanopartículas sobre vidrio y el aumento de el tamaño son los factores que determinan la amplificación de la emisión

para Rodamina-B. En este sentido una forma de relacionar el aumento del campo eléctrico con el aumento en el tamaño de las nanopartículas, es a través del modelo descrito en el capítulo 2 sección 2.3, que permite calcular de forma aproximada la magnitud del campo electromagnético amplificado ( $E_i$ ) o la intensidad de campo EM amplificado ( $I = E_i^2$ ), para una esfera de plata de radio ( $a$ ), en función de la distancia ( $d$ ) de propagación de este campo electromagnético desde el perímetro de la esfera (ver ecuación 5.5).

$$E_i^2 \approx \left( \frac{a^3}{(a+d)^3} \right)^2 + 1 \quad (5.5)$$

El valor de  $d$  corresponde a  $\sim 10$  Å que es el recubrimiento de las nanopartículas con ácido glucónico. En la figura 5.15 se observa que a medida que crece el tamaño de las nanopartículas se observa un aumento del campo EM ( $E_i^2$ ) hasta un valor constante entorno 1.96 unidades de campo electromagnético; con ello podemos decir que un mayor valor de campo EM, debido al mayor tamaño de las nanopartículas, podría explicar el aumento en la amplificación de la fluorescencia; ello puesto que, como se describe en el ecuación 5.1, el factor de amplificación de la fluorescencia es proporcional al aumento del campo eléctrico. El efecto del factor electromagnético en la amplificación de la fluorescencia es mencionado en un reciente trabajo de Le Ru y col.<sup>13</sup> así como en publicaciones anteriormente de Kahl y col.<sup>58</sup> y Schatz y col.<sup>33</sup>.



**Figura 5.14** Campo electromagnético generado en la superficie de la esfera en función del tamaño de la nanopartículas

Finalmente los resultados expuestos en este capítulo nos permiten decir que la superficie de plata-ácido glucónico es una superficie eficiente para amplificar la intensidad de la fluorescencia de Rodamina-B, ya que los resultados obtenidos son satisfactorios, si se comparan con otros trabajos en la misma área de investigación, que han reportado amplificación para esta sistema molecular sobre superficies de plata<sup>10, 19, 27, 79</sup>. Además, nuestros resultados muestran que el aumento de la extinción y del tamaño de las nanopartículas en la superficie de plata-ácido glucónico le otorgan a esta superficie propiedades interesantes a la hora de encontrar futuras aplicaciones en la amplificación de la emisión de otros sistemas moleculares.

## 5.2 Conclusiones

A partir de los valores de amplificación de la señal fluorescente para Rodamina-B se muestra que la síntesis de nanopartículas de plata recubiertas con ácido-glucónico permite obtener superficies metálicas que pueden ser usadas en estudios de fluorescencia amplificada por superficie.

La mayor densidad de nanopartículas de plata per unidad de área, depositadas sobre vidrio con un espaciador que mantiene a las moléculas a una distancia fija del metal, permite amplificar la fluorescencia en 15 veces para Rodamina-B. En este sentido la amplificación de Rodamina-B puede ser explicada por aumento del campo electromagnético hecho que se justifica con el modelo teórico que grafica el aumento del campo EM en función del tamaño de las nanopartículas.

En relación a los tiempos de vida se concluye que las moléculas de Rodamina-B sobre la superficie plata-acido glucónico quedarán en promedio a la misma distancia de 10Å del metal, independientemente de la mayor cantidad de plata depositada. Por lo tanto no se debería observar una modificación de los procesos cinéticos de desactivación del primer estado excitado, tal como se mostró en la tabla 5.1. En consecuencia es posible inferir que el aumento progresivo de la amplificación de la emisión de Rodamina-B se debe tanto al aumento de tamaños de las nanopartículas como al mayor depósito de estas sobre vidrio.

Por otro lado al comparar la superficie de plata-ácido glucónico con la superficie de plata-succinato se comprobó que el recubrimiento que tenga las nanopartículas es importante a la hora de separar las moléculas de la superficie metálica, ya que, esta capa protectora debe minimizar la transferencia de energía del fluoróforo al metal y dejar a la molécula a una distancia tal para percibir el aumento del campo electromagnético generado por la superficie metálica para amplificar su señal fluorescente.

Finalmente, de acuerdo a los resultados expuestos hasta ahora se podría responder en parte a la hipótesis propuesta, ya que fue posible obtener una superficie metálica, compuesta por nanopartículas de plata recubiertas con un espaciador (ácido glucónico), que permite separar de forma efectiva las moléculas de Rodamina-B. Esto permite por un lado reducir la transferencia de energía metal-molécula y por otro amplificar la señal de emisión de este sistema molecular.

**CAPÍTULO 6**  
**ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA**  
**AUMENTADA POR SUPERFICIES PARA**  
**FENIL-TRIEENOS A BAJA**  
**TEMPERATURA.**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos.*

**Eduardo Galeano (1940-) Escritor y periodista uruguayo.**

Los sistemas moleculares derivados de la estructura trans,trans,trans-1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno cuya estructura molecular es mostrada en el capítulo 3 sección 3.1, fueron seleccionados para realizar estudios de amplificación de la fluorescencia, dado que ellos cumplen con las siguientes características;

- La absorción de las moléculas se encuentra en el rango de resonancia del plasmón de plata, que se extiende entre 380 y 1000 nm.
- Estos sistemas moleculares tienen diferentes grupos funcionales que podrían tener un efecto en la interacción con el separador metal-molécula, por ejemplo el ácido glucónico.
- El rendimiento cuántico de las especies moleculares en solución varía entre 0.1 y 0.6 lo que permite determinar su influencia en el factor de amplificación de la fluorescencia (Propiedades fotofísicas para Fenil-trienos anexo II).

## 6.1 Estudios de Amplificación a Baja Temperatura para DM-DPH y DM-PTC

Una de las propiedades fotofísicas que presentan los sistemas moleculares derivados de la estructura del DPH es la baja emisión fluorescente en estado sólido a temperatura ambiente. Trabajos publicados por Pistolas y col.<sup>88,89</sup>, Sonoda y col.<sup>90</sup> y Lin y col.<sup>91</sup> muestran que la estructura central (hexatrieno) de estos sistemas moleculares pueden tener un proceso de isomerización *trans-cis* en el primer estado excitado en estado sólido, allí el isómero *cis* se desactiva en forma no radiativa, compitiendo con la emisión fluorescente del isómero *trans*; por ello estos sistemas presentan una baja emisión en estado sólido.

La formación del isómero *cis* se debe a que los sistemas moleculares derivados del DPH producen procesos de transferencia de carga intramolecular en el estado excitado debido a la presencia de grupos dadores (-NMe<sub>2</sub>) y aceptores (fenilos, -C=O). En este sentido Sonoda y col.<sup>90</sup>, Grabowski y col.<sup>86</sup> y Lin y col.<sup>91</sup> proponen que es posible obtener fluorescencia en estado sólido bajando la temperatura de la muestras; con ello se congela la estructura molecular, bloqueando parcialmente la posibilidad de formar conformaciones como el isómero *cis* y con ello obtener emisión en estado sólido.

El estudio del efecto de la temperatura se realizó bajando la temperatura desde 0 °C a -180 °C a intervalos de 40°C, para observar el cambio en la emisión de DM-DPH y DM-PTC. Las muestras se prepararon agregando 5ul de una concentración  $1 \times 10^{-5}$  M de soluto a un vidrio de un área de 1 cm<sup>2</sup>. El equipo empleado fue un Raman Renishaw Research RM2000 equipado con un láser de

He-Cd que proporciona una línea de excitación de 442 nm, con un compartimiento de muestra que permite trabajar entre 0°C y -180 °C y que fue descrito en la sección 3.3.1 del capítulo 3.

Los espectros de absorción de las moléculas en estado sólido se muestran en la figura 6.1 y en la misma figura se muestran los espectros de absorción en solución para DM-DPH y DM-PTC.

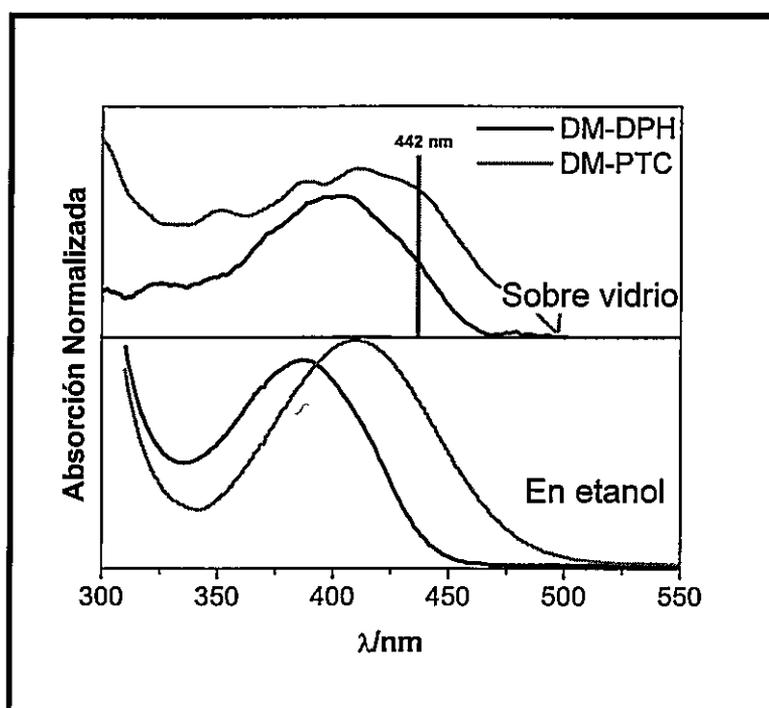
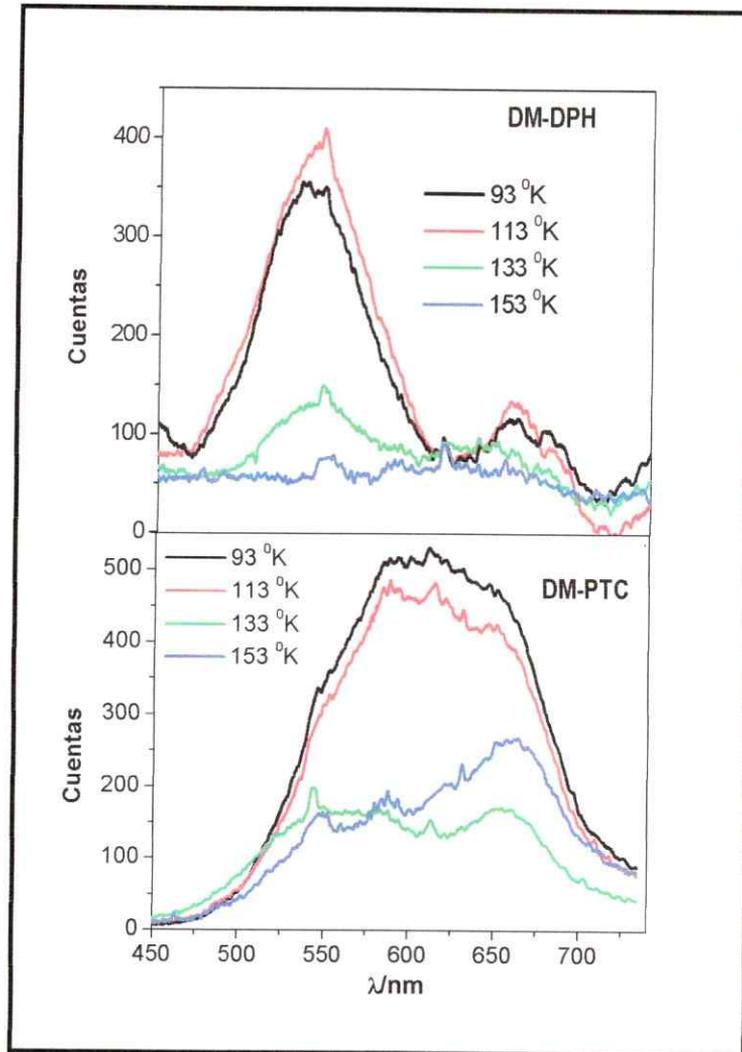


Figura 6.1 Espectros UV-visible en estado sólido y en solución para DM-DPH y DM-PTC

En la figura 6.1 se observa que existe un corrimiento al rojo de los espectros de absorción sobre vidrio de 15 nm para la absorción de DM-DPH y 4 nm para DM-PTC. Además, para ambas moléculas se observa un aumento en el ancho de banda a media altura en fase sólida con respecto a la solución de ~15 nm. Este efecto es reportado por Sonoda y col. <sup>90</sup>, quienes describen que el corrimiento al rojo y el aumento del ancho de banda media se deben a las asociaciones intermoleculares en los microcristales formados sobre el vidrio.

Una vez caracterizado los espectros UV-visible se procedieron a medir los espectros de emisión a baja temperatura para DM-DPH y DM-PTC, los que se muestran en la figura 6.2.

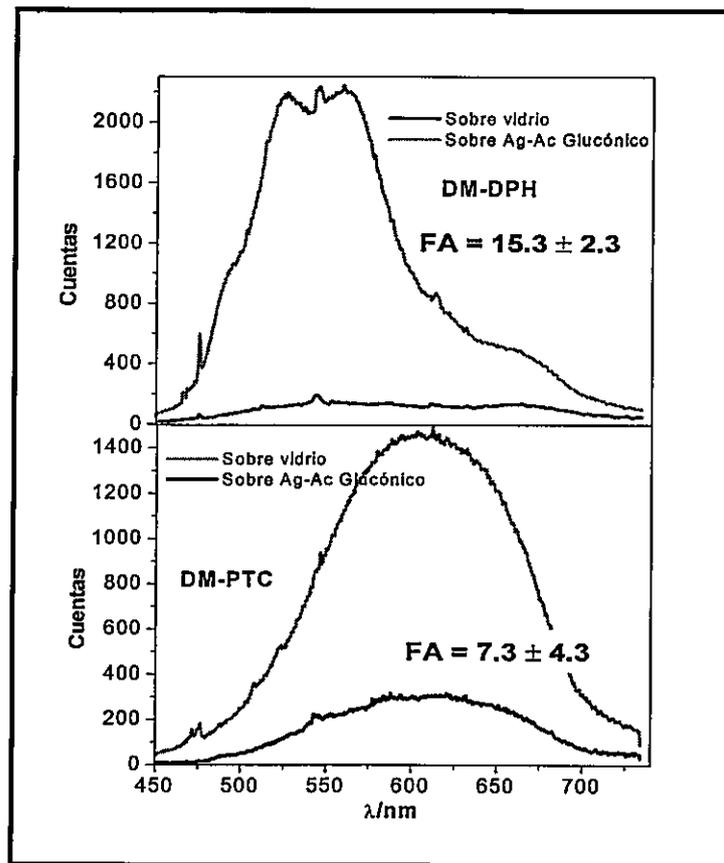


**Figura 6.2** Espectros de fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC en fase sólida en función de la temperatura

Tal como se observa en la figura 6.2, los espectros de fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC presentan un aumento en la intensidad de la fluorescencia cuando la temperatura disminuye desde 273<sup>0</sup>K a 93<sup>0</sup>K. Este comportamiento es concordante a los mostrados por Sonoda y col<sup>90</sup> quienes también observaron un aumento de la emisión de la fluorescencia para derivados del DPH en estado sólido al bajar la temperatura desde 298<sup>0</sup>K a 77<sup>0</sup>K.

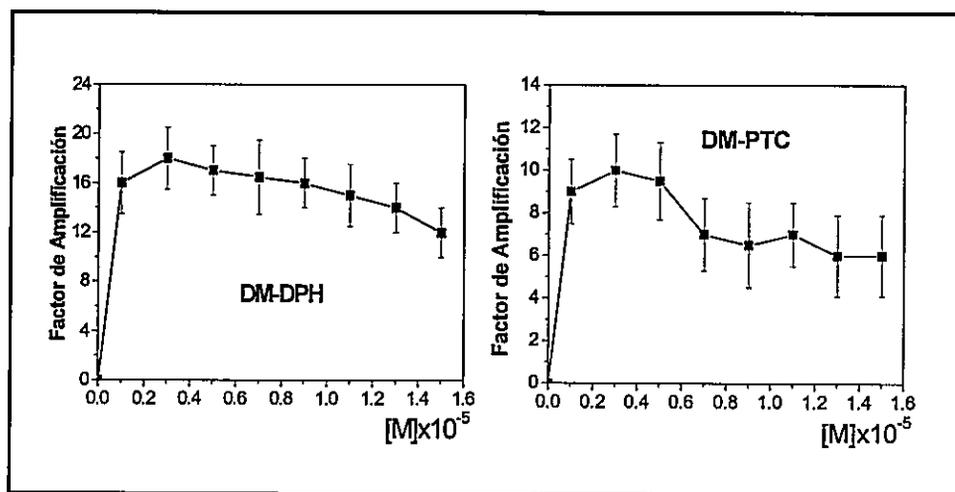
### **6.1.1 Estudio de amplificación con superficies de Plata-ácido glucónico**

Encontrada la condición óptima de temperatura, se procedió a realizar los estudios de amplificación de fluorescencia a  $93\text{ }^{\circ}\text{K}$  sobre la superficie de Ag-ácido glucónico. Las muestras fueron preparadas agregando  $5\mu\text{l}$  de una solución  $1 \times 10^{-5}\text{ M}$  en  $1\text{ cm}^2$ , sobre vidrio y sobre la superficie de Ag-aglu de 12 horas de depósito. El resultado de este estudio se muestra en la figura 6.3, donde los espectros mostrados corresponden al promedio de 4 mediciones en diferentes puntos de la superficie. Como se observa en los espectros anteriores el sustrato de Ag-ácido glucónico amplifica en forma efectiva la fluorescencia de DM-DPH en 15 veces y la de DM-PTC en 7 veces.



**Figura 6.3** Espectros de fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC a  $93^0K$  sobre superficie de plata-ácido glucónico

Para optimizar estos valores de amplificación, se realizó un experimento que permite obtener la concentración óptima de soluto a depositar sobre la superficie metálica para obtener el máximo valor de amplificación. En la figura 6.4 se muestra el factor de amplificación obtenido para una superficie de 12 horas de depósito en función de la concentración de soluto depositado; cada una de las muestras se preparó agregando 5 ul de las distintas concentraciones donde cada factor de amplificación corresponde al promedio de 4 mediciones en diferentes puntos de la superficie. Como se observa en la figuras 6.4 la concentración que genera el óptimo valor de amplificación es aproximadamente  $4.0 \times 10^{-6}$  M, por lo tanto todas muestras preparadas utilizarán esta concentración.

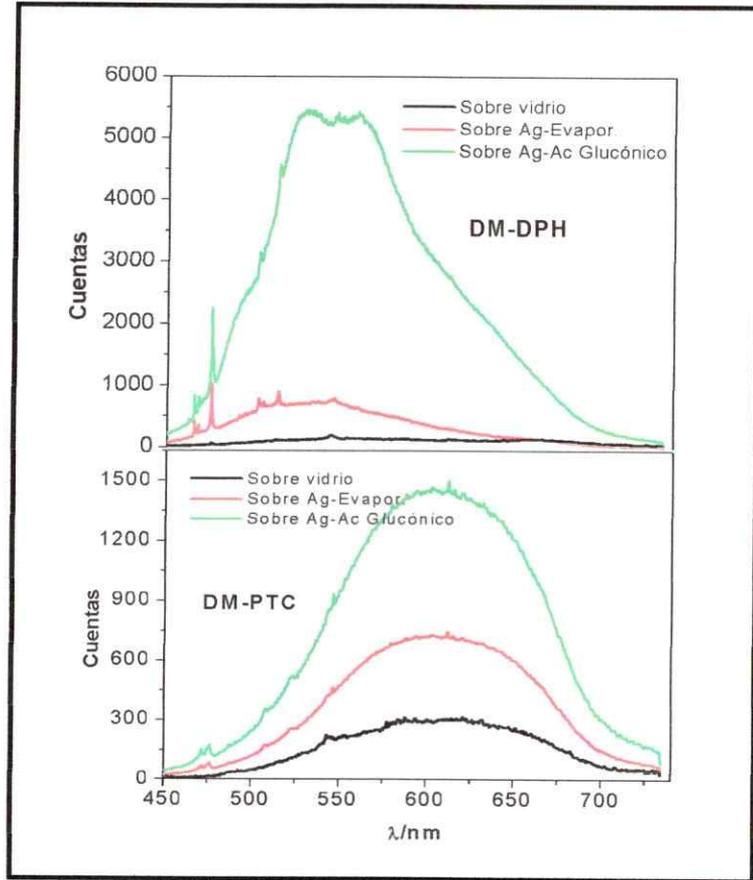


**Figura 6.4** Concentración de moléculas en función del factor de amplificación

Encontrada la concentración óptima, se verificó que el recubrimiento con ácido glucónico es suficiente para producir el efecto de la amplificación de la señal fluorescente. A partir de ello se registraron los espectros de DM-DPH y DM-PTC

sobre una superficie de plata-ácido glucónico de 12 horas y sobre una superficie de plata evaporada a alto vacío, la que no contiene ningún elemento que permita separar las moléculas de las partículas de plata. La cantidad de molécula depositada es 5ul de una concentración de  $4.0 \times 10^{-6}$  M. El resultado de este estudio se muestra en la figura 6.5, donde se observa que cuando las moléculas se encuentran en contacto directo con la superficie evaporada prácticamente no hay amplificación de la fluorescencia, debido al proceso de transferencia de energía entre la molécula y la superficie metálica la que apaga la emisión fluorescente. Por lo tanto, en esta condición la amplificación se produce en la dispersión Raman resonante, dando origen a un espectro de Resonancia Raman Amplificada por Superficie (SERRS). En la superficie de plata-ácido glucónico el recubrimiento de las partículas permite disminuir el efecto de transferencia de energía y generar la amplificación de la señal fluorescente.

Para los espectros SERRS, las bandas vibracionales observadas son  $\nu_{C=C}$  ( $1561 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_{C-C}$  ( $1142 \text{ cm}^{-1}$  y  $1251 \text{ cm}^{-1}$ ) y  $\nu_{C-H}$  ( $2722 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2829 \text{ cm}^{-1}$ ); además se observan algunos sobretonos a  $3150 \text{ cm}^{-1}$  del estiramiento  $\nu_{C=C}$  ( $1561 \text{ cm}^{-1}$ ) para la molécula de DM-DPH; mientras que las bandas observadas para el espectro de DM-PTC corresponden a  $\nu_{C=C}$  ( $1579 \text{ cm}^{-1}$ ) y  $\nu_{C-C}$  ( $1302 \text{ cm}^{-1}$ ). (La asignación vibracional completa para estos sistemas moleculares se muestra en el anexo I).



**Figura 6.5** Espectros de fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC sobre la superficie de plata-ácido glucónico (con separador) y sobre la superficie de plata evaporada al vacío (sin separador)

## 6.1.2 Estudio de amplificación con diferentes superficies de Plata-ácido glucónico

Al igual que el estudio realizado en el capítulo 5 para Rodamina-B, en esta sección estudiaremos el efecto sobre la fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC de las diferentes superficies construidas a partir de distintos tiempos de depósito de nanopartículas sobre vidrio. Para el caso de estos sistemas moleculares la línea de excitación corresponde a 442 nm. En la figura 6.6 se muestra el cambio en la extinción a esta longitud de onda. Al igual que el capítulo 5, se observa que el aumento en el tiempo de depósito tiene un efecto en la extinción, llegando a un valor máximo de saturación de 0.55.

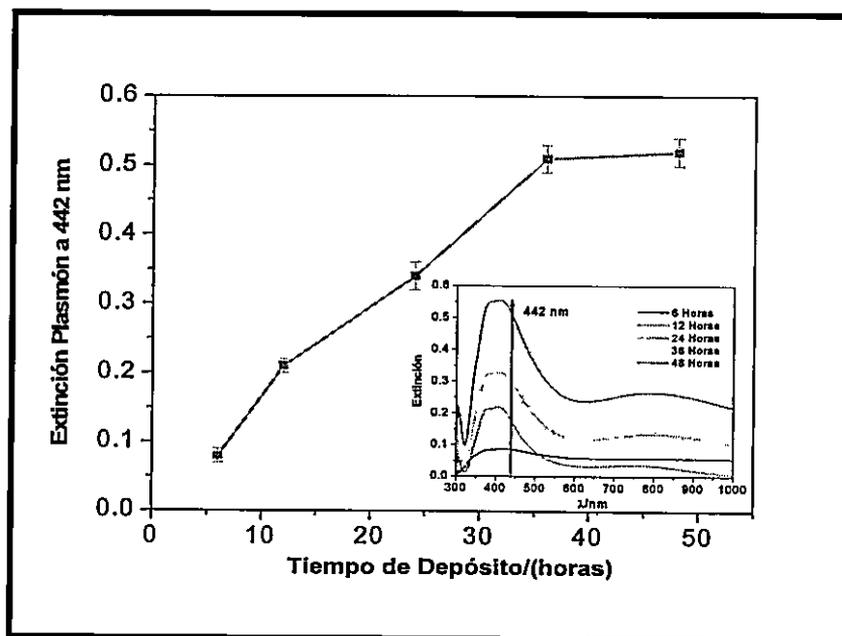
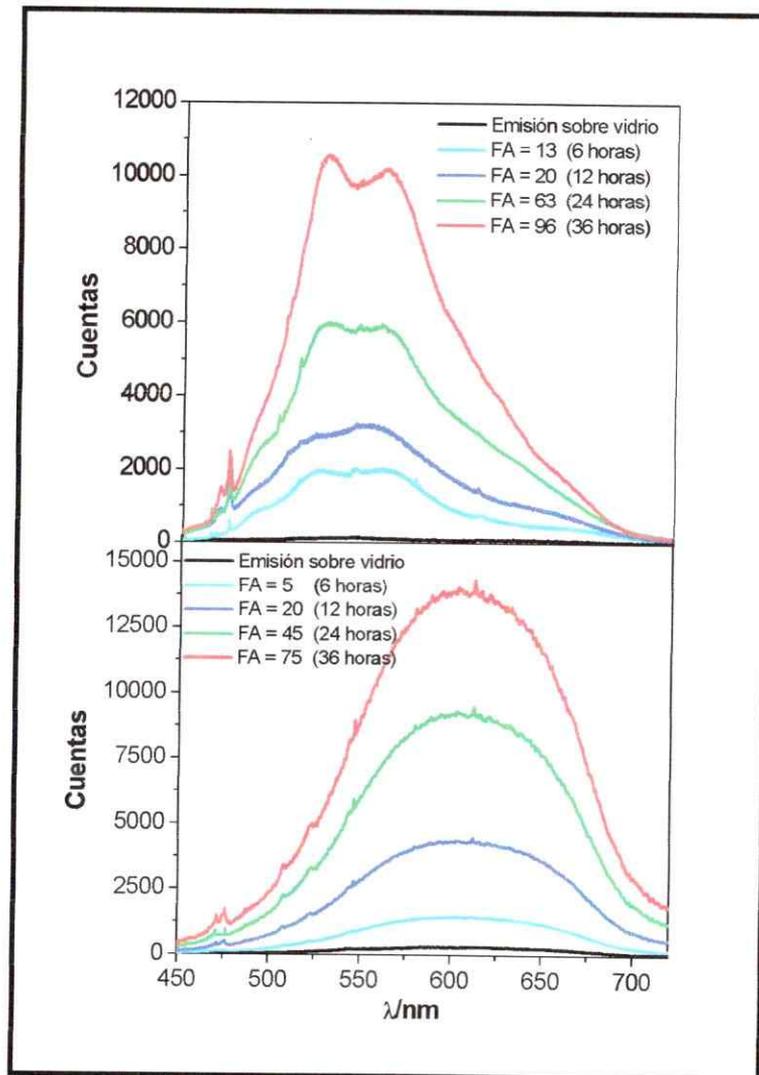


Figura 6.6 Extinción a 442 nm en función del tiempo de depósito de plata-ácido glucónico

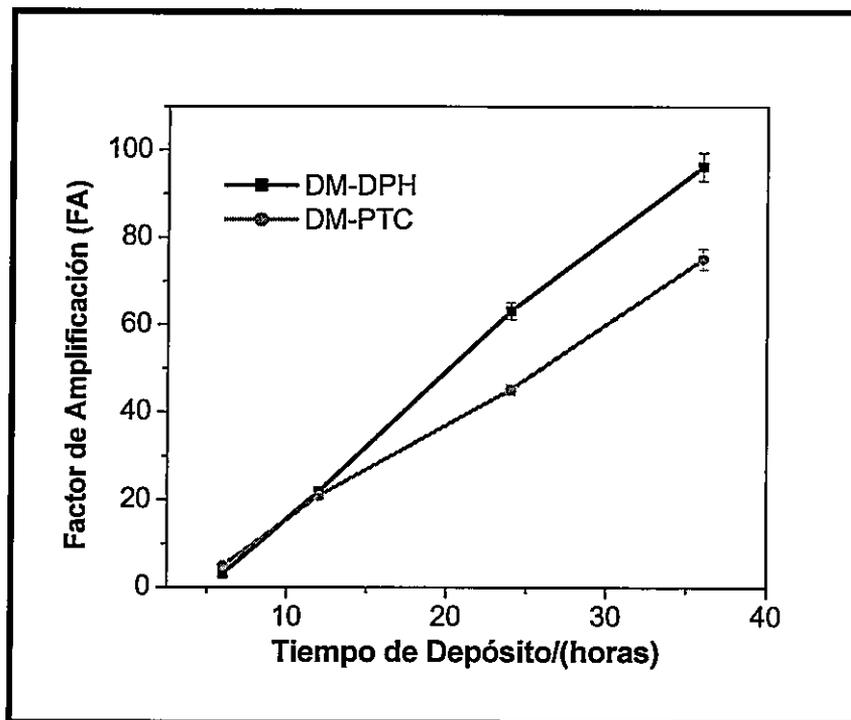
Las muestras fueron preparadas depositando 5 $\mu$ l de una concentración de  $4.0 \times 10^{-6}$ M y los espectros mostrados corresponden al promedio de 4 mediciones en diferentes puntos de la superficie. Los resultados de este estudio para DM-DPH y DM-PTC se muestran en la figura 6.7.



**Figura 6.7** Espectros de fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC depositados sobre superficies de plata-ácido glucónico obtenido con diferentes tiempos de depósito

El resultado más relevante de la figura 6.7, es la amplificación de 96 veces para el sistema molecular DM-DPH, emisión que fue medida con una superficie de 36 horas de depósito. Este factor de amplificación de magnitud  $\sim 10^2$  se encuentra dentro de los máximos reportados para los estudios de SEF para diferentes sistemas moleculares tales como, Rodamina-B, Rosa de bengala, etc <sup>11, 19, 27, 79</sup>.

Por otro lado, la máxima amplificación para DM-PTC es de 75 veces, magnitud que también es importante pero por debajo del valor obtenido para DM-DPH bajo las mismas condiciones experimentales. En la figura 6.8 se muestra un resumen que relaciona el factor de amplificación con el tiempo de depósito de plata sobre vidrio para cada uno de los sistemas moleculares. En esta figura se observa que a medida que aumenta la cantidad de plata sobre vidrio también aumenta la fluorescencia de los dos sistemas moleculares; esta es una tendencia similar a la observada en los resultados obtenidos para Rodamina-B en el capítulo 5. Esto nos permite concluir que una mayor cantidad de plata sobre vidrio, hecho que se expresa en el aumento de la extinción del plasmón y el aumento progresivo de los tamaños de las nanopartículas del metal, genera un aumento gradual en la amplificación de la fluorescencia.



**Figura 6.8 Dependencia del factor de amplificación de la fluorescencia con el tiempo de depósito de nanopartículas**

La condición específica ( $93 \text{ }^{\circ}\text{K}$ ) en la cual fueron obtenidos estos resultados nos permite inferir que la condición de baja temperatura permite congelar la estructura molecular de DM-DPH y DM-PTC eliminando los mecanismos de desactivación no radiativos que compiten con la fluorescencia, favoreciendo así la emisión fluorescente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Aroca y col.<sup>54, 55</sup>, quienes demuestran que los espectros de fluorescencia amplificados a baja temperatura son mayores a los obtenidos en similares condiciones pero a temperatura ambiente<sup>92</sup>.

En relación al menor factor de amplificación obtenido para DM-PTC con respecto a la amplificación de DM-DPH no tenemos una respuesta clara por ahora, a pesar que estos sistemas moleculares tienen una emisión en estado sólido parecida (ver figura 6.2). En este sentido pensamos que en el estado excitado las moléculas de DM-DPH y DM-PTC tienen un comportamiento distinto, debido a sus diferentes grupos funcionales dadores y aceptores de carga, los cuales pueden generar distintos procesos de transferencia de carga intermolecular el estado excitado.

En este sentido algunos autores como Kawasaki<sup>93</sup> y Pan<sup>79</sup> proponen que la amplificación de la fluorescencia depende del estado excitado molecular y de los mecanismos de desactivación no radiativos, los que al competir con la fluorescencia no permitan amplificar la señal de emisión a pesar que la molécula esté en una condición ideal de distancia metal-molécula, concentración, etc.

## 6.2 Conclusiones

A partir de los valores de amplificación de la señal fluorescente obtenidos para DM-DPH y DM-PTC a baja temperatura, se encuentra que con nuestra superficie de plata-ácido glucónico es posible obtener amplificaciones del orden de  $10^2$  veces, valores de amplificación que se acercan a los máximos reportados experimentalmente para la amplificación de la señal fluorescente por efecto de superficies metálicas de plata.

Además el estudio a baja temperatura entrega un metodología que podría ser utilizada para otros derivados del DPH que al igual que nuestros sistemas moleculares no presentan emisión a temperatura ambiente, debido a eficientes procesos de desactivación no radiativos.

Al comparar la superficie de plata ácido glucónico con la superficie de plata evaporada, se observa que no hay amplificación de la fluorescencia cuando las moléculas se encuentran en contacto directo con la superficie metálica, dando origen a un espectro SERRS, mientras que las nanopartículas recubiertas con ácido glucónico permiten producir el efecto de amplificación en la fluorescencia (SEF). Esto permite demostrar que recubriendo nanopartículas metálicas con sistemas moleculares ópticamente inertes como el ácido glucónico es posible subsanar el problema de separación entre el metal y la molécula.

Finalmente, al igual que en el capítulo 5, se encuentra que un mayor tiempo de depósito de nanopartículas metálicas sobre vidrio, que se expresa en un mayor valor extinción del plasmon de plata, permite amplificar la fluorescencia hasta 90 veces para DM-DPH y 76 veces para DM-PTC. Esta metodología que permitió incrementar la fluorescencia en un factor de  $10^2$ , se presenta como una alternativa a la habitualmente reportada <sup>18, 19, 79</sup>, en que el parámetro a modificar es la distancia metal-molécula.

**CAPÍTULO 7**  
**ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA**  
**AUMENTADA POR SUPERFICIES.**  
**ESTUDIOS CON FENIL-TRIEENOS.**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Sembremos la llanura antes de arar la loma.*  
Pablo Neruda (1904-1973) Poeta chileno.

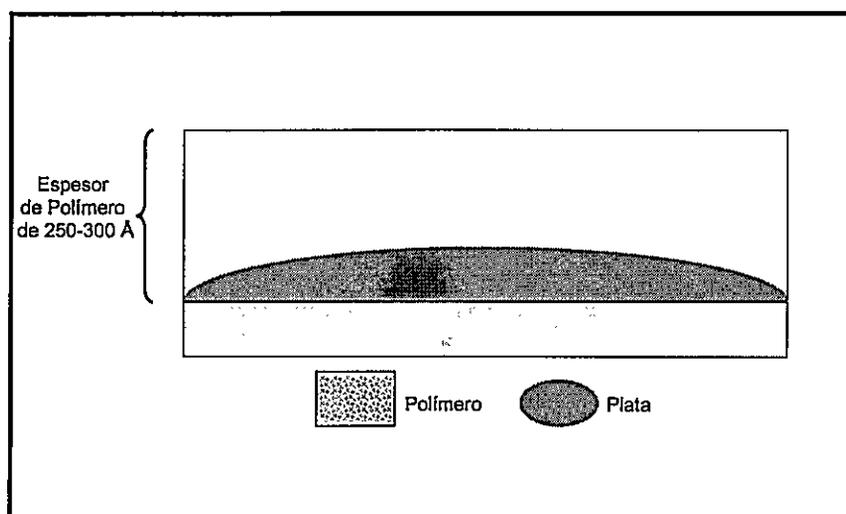
## 7.1 Estudios SEF Usando como Espaciador a Formvar

Dado que no es posible observar la fluorescencia de DM-DPH y DM-PTC a temperatura ambiente debido a la isomerización trans-cis que curre en el primer estado excitado, en este capítulo se ideó una metodología que permite mantener la estructura congelada a temperatura ambiente.

La metodología consiste en depositar en forma controlada el polímero polivinil formal Formvar, sobre vidrio o superficie metálica y luego agregar sobre éste las moléculas de soluto en etanol, las cuales difunden parcialmente en el interior del polímero. Evaporado el solvente el polímero recupera su rigidez dejando encapsuladas las moléculas en un medio de alta viscosidad. Esto permite dos cosas, congelar la estructura de los derivados del DPH lo que ayuda a bloquear el proceso de isomerización que conducen a procesos no radiativos, permitiendo la observación de la emisión y lograr que el polímero genere el espaciado el metal y las moléculas permitiendo con ello observar el efecto de amplificación de la emisión. El uso de polímeros para estudios de fluorescencia amplificada por superficie ha sido recientemente reportado por Kawasaki y Mine <sup>93</sup>. En nuestro estudio se espera que esta nueva disposición experimental, distinta a las mostrados en el capítulo 5 y 6, permita observar el efecto de amplificación de la fluorescencia de los Fenil-trienos a 25 °C. Además la posibilidad de agregar el polímero a distintas superficies metálicas permitirá evaluar el efecto de diferentes formas y tamaños de nanopartículas metálicas en la amplificación de la fluorescencia.

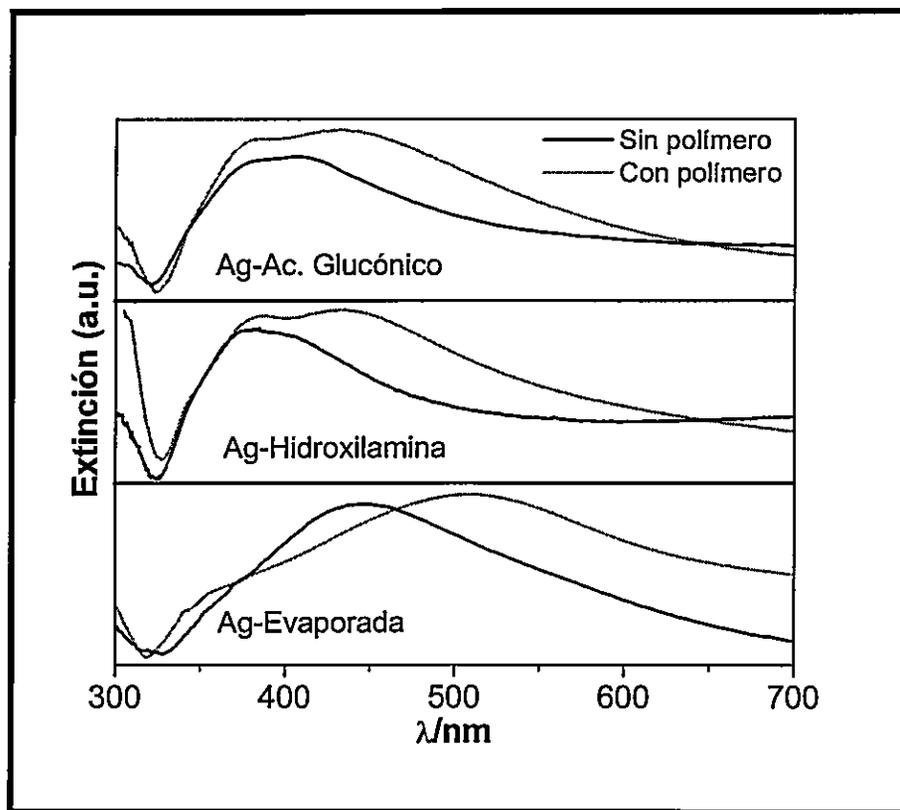
El primer paso en la preparación del arreglo experimental mostrado en las figuras 7.1 es la fabricación de las diferentes superficies metálicas a partir de los coloide de plata glucosa y plata hidroxilamina, donde fue fijado un depósito de plata sobre vidrio de 36 horas. Por otra parte para la superficie de evaporada se trabajo con un depósito máximo de 6 nm de plata.

Luego se depositó el polímero sobre cada una de las superficies metálicas como se explica en el capítulo 3, sección 3.2.1. El espesor de polímero utilizado fue de 25 a 30 nm ó 250-300 Å, ya que con este espesor se obtuvo el máximo valor de amplificación de la fluorescencia de acuerdo a un estudio de optimación mostrado en el anexo III. La caracterización de esta superficie se realizó a través de los espectros de extinción.



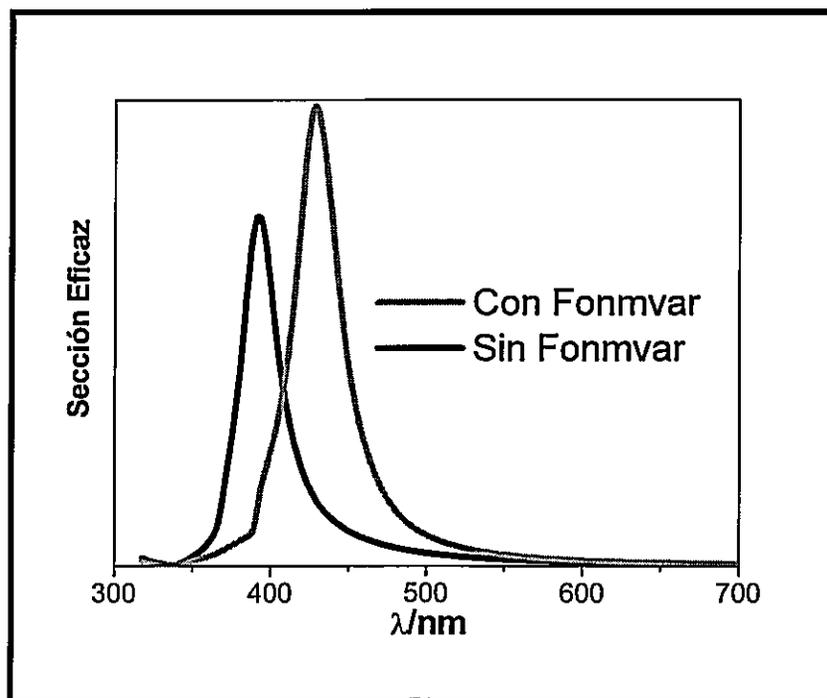
**Figura 7.1** Esquema de superficies metálicas de plata recubiertas con polivinil formal (Formvar)

En la figura 7.2 se muestra la comparación entre los espectros de extinción de las superficies con y sin polímero. En esta figura se observa un corrimiento al rojo en el máximo de los espectros de extinción de aproximadamente de 60 nm; esto se debe al cambio en la constante dieléctrica del medio, ya que las nanopartículas que no están recubiertas con polímero tienen una constante dieléctrica de un valor cercano a 1 (aire), mientras que las nanopartículas recubiertas tienen un valor aproximado de 1.5.



**Figura 7.2** Espectros de extinción de superficies metálicas con y sin polímero

Para comprobar este efecto se recurre a la teoría de Mie, que permite obtener el espectro de extinción de una nanopartícula de plata de 50 nm de diámetro en dos diferentes medios, aire ( $n=1$ ) y polímero ( $n=1.56$ , valor determinado experimental para fonmvar).

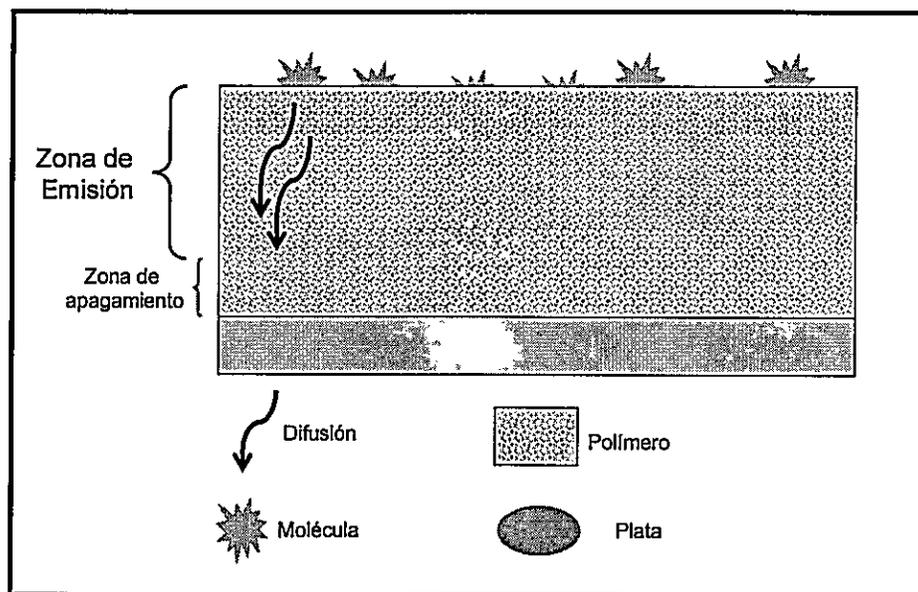


**Figura 7.3** Espectros de extinción para una nanopartícula de plata en aire y polímero

Como se observa en la figura 7.3, el máximo del espectro presenta un desplazamiento al rojo de 50 nm, valor que reproduce el corrimiento en 60 nm observado en la figura 7.2. Esto muestra que la constante dieléctrica del medio tiene una influencia importante en la posición espectral que presenta el plasmón para un mismo tamaño de nanopartícula. Además se descarta un aumento en el tamaño de las

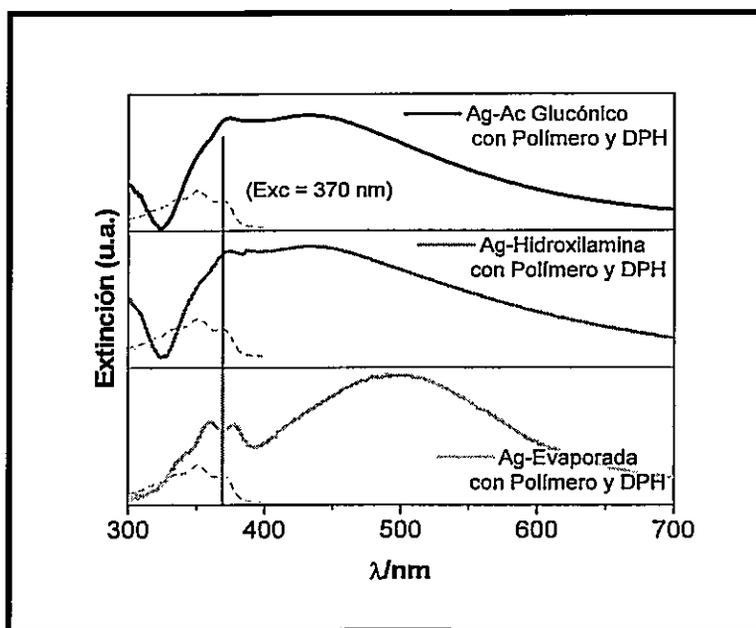
nanopartículas, ya que esto sólo se produce cuando se deposita una mayor cantidad de nanopartículas sobre vidrio.

Determinado el efecto del polímero sobre la superficie metálica, se procede a agregar sobre estas superficies de plata-polímero la cantidad óptima de moléculas que corresponde a 5  $\mu\text{l}$  ( $5 \times 10^{-4}$  M) en un área de  $2 \text{ cm}^2$  (ver estudios de optimización anexo III). Si se observa la figura 7.4 las moléculas quedan separadas del metal en una distribución de distancias, donde habrá fluoróforos que estén más cercana de la superficie y por lo tanto apagados por la transferencia de energía metal-molécula y moléculas que estén más alejadas de la superficie metálica las que presentaran amplificación de la emisión.

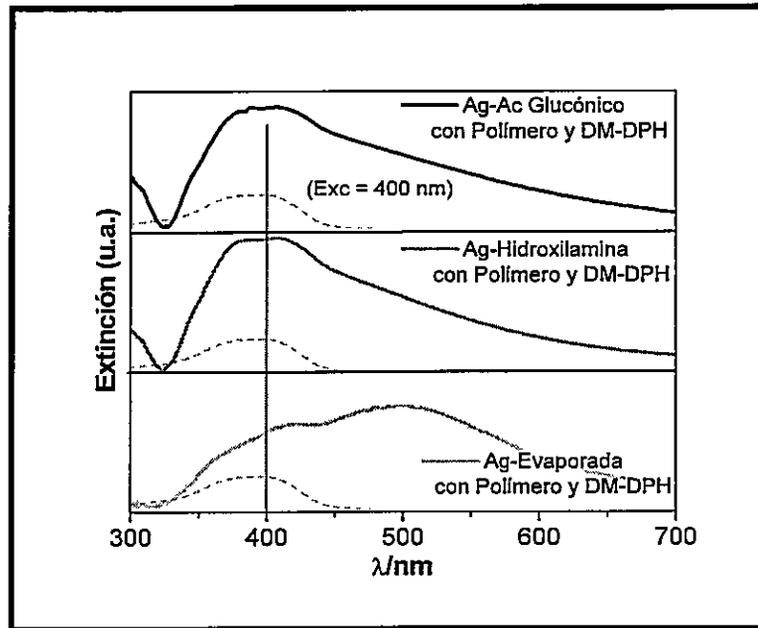


**Figura 7.4** Arreglo experimental usando polímero como espaciador metal-molécula

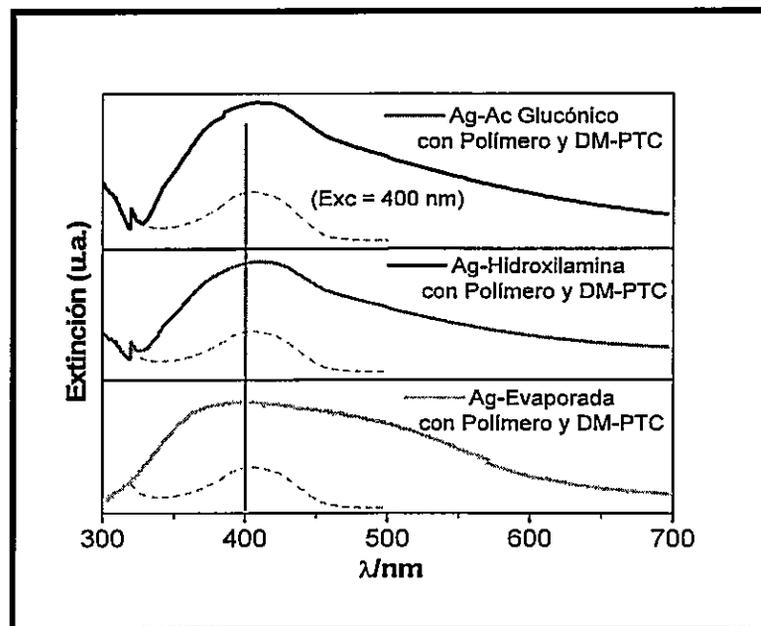
Los espectros de UV-visible de cada una de las superficies metálicas con polímero y los espectros UV-visible de las moléculas depositadas se muestran en las figuras 7.5 a 7.7. Además, con el objeto de verificar en que región espectral del plasmón de plata se encuentra la absorción de las moléculas, se muestra en línea discontinua los espectros UV-visible de las moléculas sobre vidrio con polímero.



**Figura 7.5** Espectro de absorción de DPH sobre vidrio y espectros de DPH depositado sobre diferentes superficies metálicas



**Figura 7.6** Espectro de absorción de DM-DPH sobre vidrio y espectros de DM-DPH depositado sobre diferentes superficies metálicas

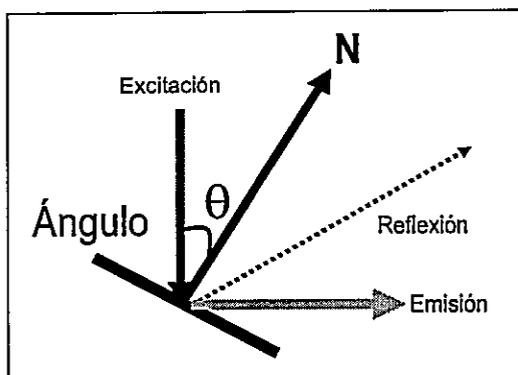


**Figura 7.7** Espectro de absorción de DM-PTC sobre vidrio y espectros de DM-PTC depositado sobre diferentes superficies metálicas

De los espectros anteriores podemos concluir que la absorción de las moléculas están en la zona máxima de resonancia con el plasmón del metal, excepto en la figura 7.5 donde el espectro UV-visible del DPH está desplazado hacia el azul alejando la absorción de este sistema molecular del máximo de la resonancia del metal.

### 7.1.1 Estudios de amplificación en diferentes superficies metálicas

Este estudio se llevó a cabo en un equipo de fluorescencia equipado con el sistema óptico de iluminación frontal que se muestra en la figura 7.8. El ángulo de incidencia de la radiación de excitación fue medido considerando dos factores; primero la emisión que llega al detector debe ser máxima, segundo, la dispersión de la luz al detector debe ser la mínima. De acuerdo a estudios, que se detallan en los anexos, el ángulo de incidencia óptimo es de  $30^{\circ}$ .



**Figura 7.8** Determinación del ángulo para iluminación frontal

La longitud de onda empleada para excitar las muestras fue de 370 nm para DPH y 400 nm para DM-DPH y DM-PTC.

Los espectros de fluorescencia obtenidos para cada una de las superficies se muestran en las figuras 7.9 a 7.11 y se resumen en tabla 7.1.

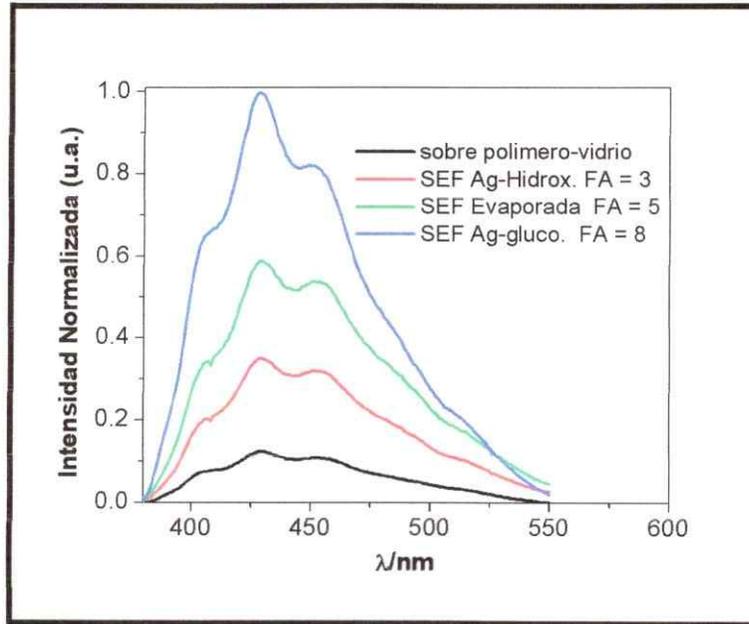


Figura 7.9 Espectros de fluorescencia de DPH sobre diferentes superficies de plata

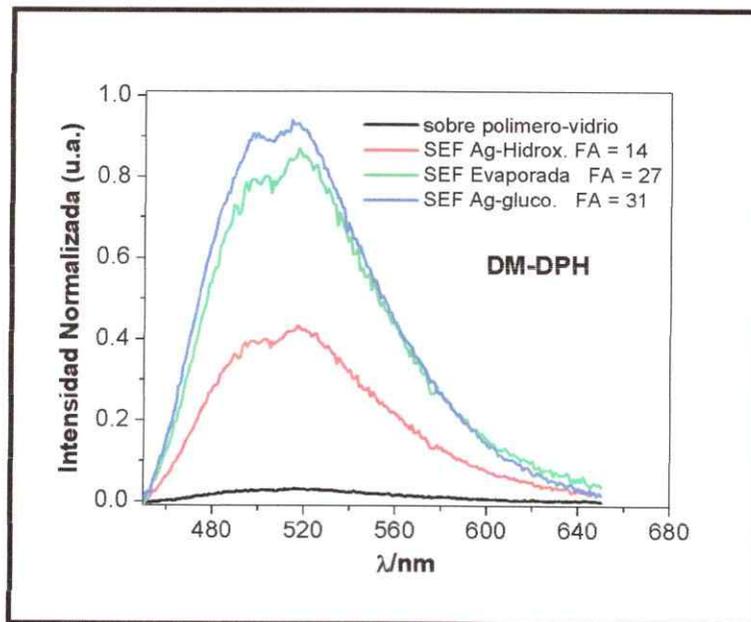
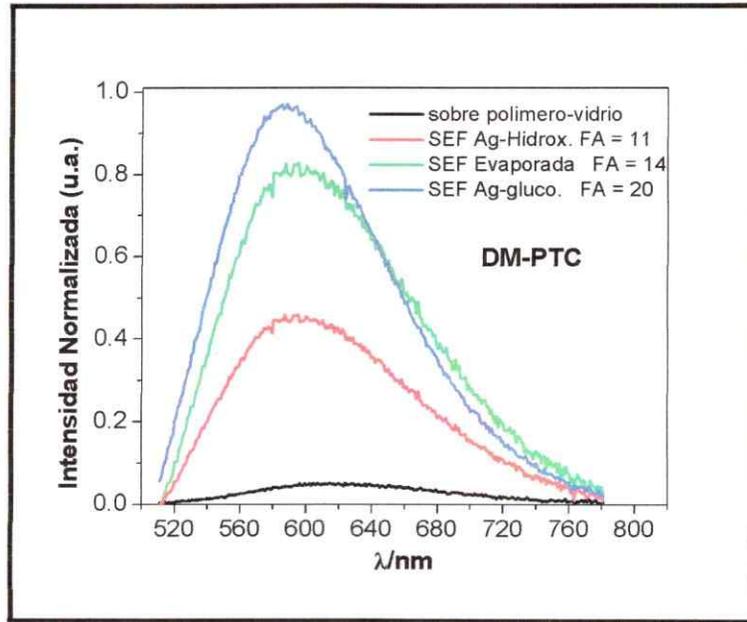


Figura 7.10 Espectros de fluorescencia de DM-DPH sobre diferentes superficies de plata



**Figura 7.11** Espectros de fluorescencia de DM-PTC sobre diferentes superficies de plata

**Tabla 7.1 Factor de amplificación obtenido empleando diferentes superficies de plata con Formvar**

Molécula	FA
DPH	
Ag-hidroxilamina	3.2 ± 0.3
Ag-Evaporada	5.3 ± 0.7
Ag-ac. glucónico	8.1 ± 0.8
DM-DPH	
Ag-hidroxilamina	14.6 ± 1.3
Ag-Evaporada	27.7 ± 2.8
Ag-ac. glucónico	31.3 ± 4.6
DM-PTC	
Ag-hidroxilamina	11.8 ± 1.1
Ag-Evaporada	14.7 ± 1.9
Ag-ac. glucónico	20.9 ± 2.0

De acuerdo a la tabla 7.1, todos los sistemas moleculares presentan amplificación de su señal fluorescente cuando se encuentran depositados sobre las superficies de plata de distinto origen. Pero DPH presenta un valor de 4 a 5 veces menor que los encontrados para DM-DPH y DM-PTC. Además en todos los casos DM-DPH presenta una valor ligeramente mayor que DM-PTC. Esta tendencia ya fue observada en estudios de amplificación a baja temperatura, lo que indica que existe un factor común que determina la amplificación para estos dos sistemas moleculares.

Por otro lado, la superficie preparada a partir del coloide de hidroxilamina tiene el menor efecto de amplificación si se compara en forma particular para cada sistema molecular y entre los tres sistemas moleculares (DPH, DM-DPH y DM-DPH). La superficie de plata-ácido glucónico muestra los mejores resultados para cada uno de los sistemas moleculares. Estos distintos factores de amplificación pueden ser explicados en términos de las propiedades ópticas de cada una de las superficies. Autores como Aslan<sup>63</sup> y Lakowicz<sup>47</sup> han reportado que el apagamiento

y la emisión de un fluoróforo cercano a una superficie metálica se relaciona con las propiedades ópticas de la nanopartículas que componen la superficie metálica.

En este sentido, de acuerdo a la caracterización de las superficies metálicas realizada en el capítulo 4, se muestra que el coloide de hidroxilamina genera superficies metálicas compuestas mayoritariamente por partículas esféricas de 80 nm de diámetro, hecho que también fue reportado por Leopold <sup>69</sup>. En cambio, las superficies de Ag-ácido glucónico y Ag-evaporada están compuestas por diferentes formas geométricas (esféricas y elipsoidales) y tamaños de nanopartículas que van desde los 70 nm a 500 nm. Por lo tanto es probable que la mayor amplificación de la fluorescencia para DPH, DM-DPH y DM-PTC se deba al mayor tamaño de las nanopartículas de cada una de las superficies. En este sentido y tal como se demuestra en el capítulo 5 partículas metálicas de gran tamaño favorecen la amplificación de la fluorescencia, debido a que partículas de mayor tamaño generan un mayor campo electromagnético.

## 7.1.2 Estudios cinéticos de los Fenil-trienos sobre distintas superficies metálicas

El primer paso para realizar este estudio cinético fue medir los tiempos de vida de los Fenil-trienos en solución y observar si existe algún cambio en ellos al pasar al estado sólido. Los resultados de los estudios cinéticos se muestran en las tablas 7.2, 7.3 y 7.4.

**Tabla 7.2 Estudio cinético para Fenil-trienos en polímero y en solución**

Molécula	$\tau_1$	$f_1$	$\tau_2$	$f_2$	$\langle\tau\rangle^*$	$\chi^2_{red}$
<b>DPH</b>						
En Etanol	$1.80 \pm 0.12$	<i>0.17</i>	$5.40 \pm 0.40$	<i>0.83</i>	$4.78 \pm 0.45$	1.1
Polímero/ vidrio	$1.61 \pm 0.14$	<i>0.23</i>	$6.51 \pm 0.55$	<i>0.77</i>	$5.10 \pm 0.50$	1.6
<b>DM-DPH</b>						
En Etanol	$4.53 \pm 0.44$	<i>0.13</i>	$0.11 \pm 0.01$	<i>0.87</i>	$0.69 \pm 0.05$	1.0
Polímero/ vidrio	$2.01 \pm 0.17$	<i>0.34</i>	$0.50 \pm 0.05$	<i>0.66</i>	$1.01 \pm 0.09$	1.9
<b>DM-PTC</b>						
En Etanol	$3.86 \pm 0.35$	<i>0.16</i>	$0.39 \pm 0.02$	<i>0.84</i>	$0.95 \pm 0.07$	1.2
Polímero/ vidrio	$4.90 \pm 0.43$	<i>0.15</i>	$0.97 \pm 0.08$	<i>0.85</i>	$1.56 \pm 0.12$	1.9

\* Tiempos de vida medidos solo en función de la fase, la línea de excitación fue 375 nm con intensidad modulada

Al analizar la tabla 7.2 se encuentra que el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia en polímero y en solución se ajusta a un modelo biexponencial, esto quiere decir que en el estado excitado existen dos especies caracterizadas por los tiempos de vida  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ , y las fracciones  $f_1$ ,  $f_2$ , respectivamente. Ambos tiempos de vida se suman para dar origen al tiempo de vida promedio, definido por  $\langle\tau\rangle = \tau_1 * f_1 + \tau_2 * f_2$ . En la tabla anterior se observa además que los tiempos de vida

en el polímero experimentan un leve aumento debido a que el polímero restringe el movimiento de la estructura molecular; esto también ha sido reportado por otros autores, llegando a la misma conclusión <sup>80, 86, 88, 90</sup>.

La característica de tener dos especies en el estado excitado para este tipo de moléculas en solución ya ha sido reportado por algunos autores como Grabowsky y col. <sup>86</sup> quienes a través de técnicas resueltas en el tiempo miden dos tiempos de vida del estado excitado para los derivados del DPH y DM-DPH. Sólo para DM-PTC no fue posible realizar una comparación dado que en la literatura no existe una caracterización espectral y/o cinética de desactivación para este sistema molecular.

El hecho que los decaimientos se ajusten a dos canales de desactivación radiativos para un sistema que está incorporado en un polímero indica que antes de congelar la estructura existe un equilibrio en el estado fundamental entre dos especies. Esto es reportado por Lin en 1988 <sup>91</sup> para muestras sólidas, quien propone que en el estado excitado las moléculas pueden ser de dos tipos una trans y otra flexionada en el enlace central hexatrieno. El mismo autor propone además que al congelar la estructura de estas moléculas a 77 °K, se estabiliza mayoritariamente la estructura trans.

Ahora considerando sólo el tiempo de vida promedio  $\langle\tau\rangle$ , es posible calcular el rendimiento de emisión total para cada uno de los Fenil-trienos en estado sólido. Se utilizó la misma metodología empleada para Rodamina-B (pag 124-125). El resultado de esto se muestra en la tabla 7.3; los tiempos de vida naturales calculados para los Fenil-trienos empleando la ecuación de Strickler y Berg son; DPH ( $6.80 \pm 0.50$  nseg), DM-DPH ( $3.10 \pm 0.22$  nseg) y DM-PTC ( $6.05 \pm 0.53$  nseg).

**Tabla 7.3 Rendimiento de emisión para Fenil-trienos en polímero y solución**

Molécula	$\phi_{\text{ciclohexano}}^*$	$\phi_{\text{Polímero}}$
DPH	$0.63 \pm 0.05$	$0.75 \pm 0.08$
DM-DPH	$0.11 \pm 0.01$	$0.32 \pm 0.03$
DM-PTC	$0.08 \pm 0.01$	$0.26 \pm 0.02$

\*Determinados a partir de sulfato de quínina

Como se observa en la tabla 7.3 el rendimiento cuántico de emisión de los Fenil-trienos aumenta al pasar de ciclohexano a polivinil formal confirmando el hecho que congelando la estructura molecular de estos sistemas aumenta el rendimiento de emisión, tendencia que también se observa al aumentar la viscosidad del solvente (ver anexo II). En esta misma tabla además se observa que DPH en el polímero tiene un rendimiento cuántico de emisión de 0.75, valor mas alto que los obtenidos para DM-DPH y DM-PTC. Esto podría indicar que para este arreglo experimental se cumple que el factor de amplificación es inversamente proporcional al rendimiento de emisión.

Finalmente se realizó la medición de los tiempos de vida para cada una de las moléculas depositadas en las diferentes superficies metálicas recubiertas con polímero. El resultado de este estudio se muestra en la tabla 7.4.

**Tabla 7. 4 Tiempos de vida para Fenil-trienos sobre superficies metálicas**

Molécula	$\tau_1$	$f_1$	$\tau_2$	$f_2$	$\langle\tau\rangle$	FA	$\chi^2_{red}$
<b>DPH</b>							
Polímero/ vidrio	1.61 ± 0.14	0.23	6.51 ± 0.55	0.77	5.10 ± 0.56	---	1.1
Ag-hidroxilam.	1.01 ± 0.09	0.22	4.45 ± 0.45	0.78	3.67 ± 0.45	3.9 ± 0.3	1.8
Ag-Evaporada	1.12 ± 0.10	0.22	4.61 ± 0.40	0.78	3.85 ± 0.43	5.5 ± 0.7	2.1
Ag-ac. glucónico	1.02 ± 0.09	0.25	4.90 ± 0.47	0.75	3.94 ± 0.49	8.0 ± 0.8	1.7
<b>DM-DPH</b>							
Polímero/ vidrio	2.01 ± 0.17	0.34	0.50 ± 0.05	0.66	1.01 ± 0.09	---	1.1
Ag-hidroxilam.	2.00 ± 0.19	0.25	0.07 ± 0.01	0.75	0.55 ± 0.05	14.2 ± 1.3	2.2
Ag-Evaporada	1.55 ± 0.14	0.31	0.19 ± 0.02	0.69	0.62 ± 0.05	27.1 ± 2.5	1.9
Ag-ac. glucónico	2.50 ± 0.21	0.22	0.25 ± 0.03	0.78	0.75 ± 0.06	31.7 ± 4.6	1.9
<b>DM-PTC</b>							
Polímero/ vidrio	4.90 ± 0.43	0.15	0.97 ± 0.08	0.85	1.56 ± 0.12	---	1.0
Polímero/ vidrio	3.86 ± 0.35	0.16	0.39 ± 0.02	0.84	0.74 ± 0.07	11.4 ± 1.1	1.5
Ag-hidroxilam.	2.61 ± 0.25	0.22	0.43 ± 0.04	0.78	0.91 ± 0.05	14.7 ± 1.9	2.0
Ag-Evaporada	3.28 ± 0.30	0.21	0.40 ± 0.03	0.79	1.01 ± 0.08	20.6 ± 2.0	2.0

Si analizamos los valores de la tabla 7.4, se observa que existe una disminución del tiempo de vida del estado excitado sobre las superficies metálicas, esto debido al proceso de transferencia de energía molécula-metal. En cuanto a las especies ( $f_1$  y  $f_2$ ), no se observan grandes cambios en cada una de las muestras. Además se observa que para la superficie de plata-hidroxilamina se obtienen los tiempos de vida más bajos, con una diferencia con respecto a las otras dos superficies de 200 picoseg aproximadamente. Esto se observa para los tres sistemas moleculares en la superficie de plata-hidroxilamina.

Por lo tanto este resultado podría confirmar que un tiempo de vida más corto sobre el metal tiene asociado un menor factor de amplificación de la señal fluorescente (superficie de plata-hidroxilamina). En este sentido estos valores podrían indicar una relación entre la cinética de la molécula y el factor de amplificación.

## 7.2 Conclusiones

Con los resultados expuestos en este capítulo podemos decir que es posible observar fluorescencia amplificada de sistemas moleculares disueltos en una delgada matriz de polímero (20-30 nm). Además se muestra que el polímero puede cumplir una doble función; la primera, separar las moléculas del metal y la segunda provee un medio de alta viscosidad que permite congelar la estructura de los Fenil-trienos, lo que ayuda a observar la emisión a temperatura ambiente.

Por otra parte se mostró que el factor de amplificación depende del tamaño y de la forma de las nanopartículas de la superficie metálica. En relación a esto, partículas de tamaños superiores a 70 nm de diámetro que tienen una mayor componente de dispersión tendrán el mejor desempeño en la amplificación de la fluorescencia.

En cuanto a las diferentes magnitudes de amplificación mostradas en este capítulo para cada uno de los sistemas moleculares, se observa que moléculas con un rendimiento de emisión alto tendrán una amplificación de la fluorescencia menor (DPH) que moléculas que tienen un bajo rendimiento de emisión (DM-DPH, DM-PTC).

Por último, la caracterización cinética de las muestras en estado sólido permitió establecer que los derivados de la estructura molecular trans-trans-trans-difenilhexatrieno tiene un equilibrio entre de dos especies tanto en el estado fundamental, como en el excitado. En este sentido los valores obtenidos para Dimetilfeniltrienecetona (DM-PTC) son relevantes, ya que hasta hoy, no existen antecedentes en la literatura acerca de la caracterización del estado fundamental y del excitado para este sistema molecular.

## 8.0 Conclusiones Generales

A partir de los valores de amplificación de la señal fluorescente reportados, en esta tesis para Rodamina-B y los sistemas moleculares derivados del DPH (DM-DPH y DM-PTC), se muestra que la síntesis de nanopartículas de plata recubiertas con ácido-glucónico permite obtener superficies metálicas que pueden ser usadas en estudios de fluorescencia amplificada por superficie.

La técnica de microscopía Raman, permitió caracterizar la superficie de plata y comprobar que las nanopartículas metálicas se encuentran recubiertas con una monocapa de ácido glucónico, molécula que proviene de la oxidación de glucosa.

Al comparar la superficie de plata-ácido glucónico como en la superficie de plata-succinato, se comprobó que el recubrimiento que tenga la nanopartícula es fundamental para separar las moléculas de la superficie metálica, ya que, la capa protectora o separador debe dejar a los fluoróforos a la distancia necesaria para minimizar la transferencia de energía entre fluoróforo al metal. En este sentido las nanopartículas recubiertas con succinato cuentan con un espaciador de 5 Å, que permitió amplificar la fluorescencia de Rodamina-B en 5 veces, mientras que la superficie de plata-ácido glucónico presenta un espaciador de 10 Å, que permite amplificar la señal del mismo fluoróforo en 9 veces.

La mayor densidad de nanopartículas de plata per unidad de área, depositadas sobre vidrio con un espaciador que mantiene a las moléculas a una distancia fija del metal, permite amplificar la fluorescencia en 15 veces para Rodamina-B y 100 veces para DM-DPH y DM-PTC. Esto es un antecedente interesante en el área del SEF, ya que habitualmente para una misma densidad de nanopartículas, es la distancia fluoróforo-metal la que es modificada para aumentar la fluorescencia de las moléculas.

El estudio a baja temperatura propone que es posible obtener fluorescencia en estado sólido para derivados del DPH, ya que al congelar la estructura molecular de estos sistemas, se bloqueando parcialmente la posibilidad de formar conformaciones como el isómero cis que no presentar emisión y que compiten con la forma tras que si presenta emisión.

Los resultados expuestos el capítulo 7 muestran que es posible observar fluorescencia amplificada de sistemas moleculares disueltos en una delgada matriz de polimérica de polivinil formal de 20 a 30 nm de espesor. Además se muestra que el Formvar cumple una doble función; la primera, separar las moléculas del metal y la segunda provee un medio de alta viscosidad que permite congelar la estructura de los Fenil-trienos, lo que ayuda a observar la emisión a temperatura ambiente.

En cuanto a las diferentes magnitudes de amplificación mostradas en el capítulo 7 para cada uno de los derivados del difenilhexatrieno, se observa que moléculas con un alto rendimiento de emisión, tendrán una amplificación de la fluorescencia menor (DPH), que moléculas con bajo rendimiento de emisión (DM-DPH, DM-PTC).

Finalmente, se observó que para un mismo sistema molecular un tiempo de vida corto sobre el metal indica una menor amplificación de la señal fluorescente, con esto es posible inferir que hay una relación entre la amplificación de la señal fluorescente y la cinética de desactivación del primer estado excitado.

## 9.0 Proyecciones

Dentro de las proyecciones de esta tesis está el posible uso del sustrato de nanopartículas metálicas recubiertas con ácido glucónico en sistemas biológicos, ya que las nanopartículas se fabrican con una metodología que utiliza productos químicos de baja toxicidad. Además los ligantes orgánicos (ácido glucónico) que rodean a las nanopartículas de plata pueden ser biocompatibles con enzimas y macromoléculas biológicas.

Por otra parte sería interesante probar la síntesis de nanopartículas metálicas en solución con otros monosacáridos, de 5 y 3 átomos de carbono, pentosas y treosas, respectivamente. Esto por que en el recubrimiento de las nanopartículas sería distinto al obtenido en esta tesis (glucosa, 6 átomos de carbono), dejando a las moléculas a una menor distancia del metal, permitiendo con ello observar el efecto del espaciador sobre la amplificación en la fluorescencia.

Además es posible mejorar la metodología propuesta en esta tesis cambiando el recubrimiento de las nanopartículas metálicas y los fluoróforos, por ejemplo, separadores cargados que permitan un reconocimiento electrostático con moléculas fluorescentes que también tengan en su estructura una carga. Con esto sería posible construir de forma ordenada en estado sólido capas de separador que permitan un control de la distancia fluoróforo-metal.

En resumen, pensamos que esta tesis abre un camino promisorio en el área de la fabricación de nuevas superficies metálicas de plata, que puedan ser usadas en estudios de amplificación de la señal fluorescente (SEF).

## 10.0 Bibliografía

1. P. A. Serena, A. Correria. Nanotecnología: el motor de la próxima revolución tecnológica. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, 9, 2003, 32.
2. M. Fleischman, P. J. Hendra, A. J. Mcquillan. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.*, 26, 1974, 163.
3. R. P. Van Duyne. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J. Electro. Chem.*, 84, 1977, 1.
4. M. G. Albrecht, J. A. Crieghton. Anomalous intense raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 1977, 5215.
5. M. Moskovits. Surface enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.*, 57, 1985, 783.
6. A. M. Glass, A. Wokaun, J. P. Heritage. Enhanced two-photon fluorescence of molecule adsorbed on silver particle films. *Phys. Rev. B*, 24, 1981, 4906.
7. G. Ritchie, E. Burstein. Luminescence of dye molecules adsorbed at a Ag surface. *Phys. Rev. B*, 24, 1981, 4843.
8. J. Gersten, A. Nitzan. Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles. *J. Chem. Phys.*, 75, 1981, 1139.
9. P. J. Goulet, R. F. Aroca. Surface-enhancement of fluorescence near noble metal nanostructure. *Topics in fluorescence spectroscopy*. 2004:223.
10. J. R. Lakowicz. Review radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications. *Anal. Biochem.*, 298, 2001, 1.
11. M. B. Mohamed, V. Volkov, S. Link, M. A. El-Sayed. The 'lighting' gold nanorods: fluorescence enhancement of over a million compared to the gold metal. *Chem. Phys. Lett.*, 317, 2000, 517.
12. P. Johansson, M. Käll, H. Xu, W. Xue-Hua, M. P. Persson, H. Q. Xu. Unified treatment of fluorescence and raman scattering processes near metal surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 93, 2004, 243002.
13. E. C. Le Ru , P. G. Etchegoin. Rigorous justification of the  $|E|^4$  enhancement factor in surface enhanced raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 423, 2006, 63.
14. H. Xu, W. Xue-Hua, M. P. Persson, H. Q. Xu, M. Käll, P. Johansson. Unified treatment of fluorescence and raman scattering processes near metal surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 93, 2004, 243002.

15. K. L. Nelly, E. Coronado, L. L. Zao, G. C. Schatz. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape and dielectric environment. *J. Chem. Phys. B*, 107, 2003, 668.
16. G. C. Schatz, R. P. Van Duyne. Handbook of Vibrational Spectroscopy, electromagnetic mechanism of surface-enhanced spectroscopy. *John Wiley & Sons*, 1, 2002, 759.
17. E. J. Zeman, G. C. Schatz. An accurate electromagnetic theory study of surface enhancement factors for Ag, Li, Na, Al, Ga, In, Zn, Au and Cu. *J. Phys. Chem.*, 91, 1987, 634.
18. J. R. Lakowicz, C. D. Geddes. *Radiative Decay Engineering*. Springer; 2005.
19. M. Kawasaki, S. Mine. Enhanced molecular fluorescence near thick Ag island film of large pseudotubular nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 109, 2005, 17254.
20. P. J. G. Goulet, N. P. W. Pieczonka, R. F. Aroca. Overtones and combinations in single-molecule surface enhanced resonance raman scattering spectra. *Anal. Chem.*, 75, 2003, 1918.
21. R. Aroca, P. A. Antunes, C. J. L. Constantino. Langmuir and langmuir-blodgett films of perylene tetracarboxylic derivatives with varying alkyl chain length: Film packing and surface-enhanced fluorescence studies. *Langmuir*, 17, 2001, 2958.
22. P. J. Tarcha, J. Desaja-Gonzalez, S. Rodriguez-Llorente, R. Aroca. Surface-enhanced fluorescence on SiO<sub>2</sub>-coated silver island films. *Appl. Spectroscopy*, 53, 1999, 43.
23. K. Sokolov, G. Chumanov, T. M. Cotton. Enhancement of molecular fluorescence at the surface of colloidal metal films. *Anal. Chem.*, 70, 1998, 3898.
24. R. Aroca, C. Jennigs, G. J. Kovacs, R. O. Loutfy, P. S. Vincett. Fluorescence enhancement from langmuir-blodgett monolayers on silver island films. *Langmuir*, 4, 1988, 518.
25. A. Wokaun, H. P. Lutz, A. P. King, U. P. Wild, R. R. Ernst. Energy transfer in surface enhanced luminescence. *J. Chem. Phys.*, 79, 1983, 509.
26. C. D. Geddes, H. Cao, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, J. Fang, J. R. Lakowicz. Metal-enhanced fluorescence (MEF) due to silver colloids on a planar surface: potential applications of indocyanine green to in vivo imaging. *J. Phys. Chem. A*, 107, 2003, 3443.
27. J. R. Lakowicz, Y. Shen, S. D. Auria, J. Malicka, J. Fang, Z. Gryczynski, I. Gryczynski. Radiative decay engineering 2. Effects of silver films on fluorescence intensity, lifetimes and resonance energy transfer. *Anal. Biochem.*, 301, 2002, 261.

28. J. R. Lakowicz. Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission. *Anal. Biochem.*, 337, 2005, 171.
29. E. P. Gross, D. Bohm. Theory of plasma oscillations B. Excitation and damping of oscillations. *Phys. Rev.*, 75, 1949, 1864.
30. P. C. Hiemenz, R. Rajagopalan. *Principles of colloid and surface chemistry*. New York: Marcel Dekker; 1997.
31. G. Mie. Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Ann. Physik.*, 330, 1908, 377.
32. J. P. Kottmann, O. J. F. Martin, D. R. Smith, S. Schulz. Plasmon resonance of silver nanowires with nonregular cross section. *Phys. Rev. B*, 64, 2001, 235402.
33. E. J. Zeman, G. C. Schatz. An accurate electromagnetic theory study of surface enhancement factors for Ag, Au, Cu, Li, Na, Al, Ga, In, Zn and Cd. *J. Phys. Chem.*, 91, 1987, 634.
34. R. Aroca, F. Martin. Tuning metal island films for maximum surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.*, 16, 1985, 156.
35. J. Gersten, A. Nitzan. Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces. *J. Chem. Phys.*, 73, 1980, 302.
36. I. O. Sosa, C. Noguez, R. G. Barrera. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes. *J. Phys. Chem. B*, 107, 2003, 6269.
37. E. Hecht. *Optica*. Pearson, Addison-Wesley; 2003.
38. M. Born, E. Wolf. *Principles of Optics*. New York; 1975.
39. K. H. Drexhage. Influence of a dielectric interface on fluorescence decay time. *J. Luminesc.*, 1, 1970, 693.
40. K. H. Drexhage. *Progress in Optics XII*. North-Holland, Amsterdam; 1974.
41. K. Watanabe, D. Menzel, N. Nilius, F. Hans-Joachim. Photochemistry on metal nanoparticles. *Chem. Rev.*, 106, 2006, 4301.
42. P. W. Barber, B. J. Messinger, K. Ulrich von Raben, R. K. Chang. Local field at the surface of noble-metal microspheres. *Phys. Rev. B*, 24, 1981, 649.
43. R. F. Aroca, C. J. L. Constantino, J. Duff. Surface-enhanced raman scattering and imaging of langmuir-blodgett monolayers of bis(phenethylimido)perylene on silver island films. *Appl. Spectroscopy*, 54, 2000, 1120.

44. J. DeSaja-Gonzalez, R. Aroca, Y. Nagao, J. A. DeSaja. Surface-enhanced fluorescence and SERRS spectra of N-octadecyl-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic monoanhydride on silver island films. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 53A, 1997, 173.
45. D. A. Weitz, S. Garoff, J. I. Gersten, A. Nitzan. The enhancement of raman scattering, resonance raman scattering, and fluorescence from molecules adsorbed on a rough silver surface. *J. Chem. Phys.*, 9, 1983, 5324.
46. A. Wokaun, J. P. Gordon, P. F. Liao. Radiation damping in surface-enhanced raman scattering. *Phys. Rev. Lett.*, 1982, 957.
47. J. R. Lakowicz, K. Aslan, Z. Leonenko, C. D. Geddes. Fast and slow deposition of silver nanorods, on planar surfaces: Applications to metal-enhanced fluorescence. *J. Phys. Chem. B*, 109, 2005, 3157.
48. P. W. Barber, R. K. Chang, H. Massoudi. Electrodynamic calculations of the surface-enhanced electric intensities on large Ag spheroids. *Phys. Rev. B*, 27, 1983, 7251.
49. A. Champion, A. R. Gallo, C. B. Harris, H. J. Robota, P. M. Whitmore. Electronic energy transfer to metal surface: A test of classical image dipole theory at short distance. *Chem. Phys. Lett.*, 73, 1980, 447.
50. B. Pettinger, A. Gerolymatou. Dyes at silver colloids: the role of energy transfer processes for surface fluorescence and surface enhanced resonance Raman scattering. *Surf. Sci.*, 156, 1985, 859.
51. P. Hildebrandt, M. Stockburger. Surface-enhanced resonance raman spectroscopy of rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver. *J. Phys. Chem.*, 88, 1984, 5935.
52. M. E. Lippitsch. Surface-enhanced raman spectra of biliverdin and pyromethenone adsorbed to silver colloids. *Chem. Phys. Lett.*, 79, 1981, 224.
53. Y. Mo, J. Lei, X. Li, P. Wachter. Surface enhanced raman scattering of rhodamine 6G and dye 1555 adsorbed on roughened copper surfaces. *Solid State Communications*, 66, 1988, 127.
54. P. A. Antunes, C. J. L. Constantino, R. F. Aroca. Langmuir and langmuir blodgett films of perylene tetracarboxylic derivatives with varying alkyl chain length: film packing and surface-enhanced fluorescence studies. *Langmuir*, 17, 2001, 2958.
55. C. J. L. Constantino, T. Lemma, P. A. Antunes, P. J. Goulet, R. Aroca. Surface-enhanced resonance raman scattering. Single-molecule detection in a langmuir-blodgett monolayer. *Appl. Spectroscopy*, 56, 2003, 649.

56. Z. Zhang, A. L. Verna, M. Yoneyama, K. Iriyama, O. Ozaki. Substrate-dependent aggregation and energy transfer in Langmuir-Blodgett films of 5-(7-N-Octadecylpyridyl)-10,15,20-tri-p-toliporphirin studied by UV-Vis and fluorescence spectroscopy. *Langmuir*, 13, 1997, 5726.
57. Y. Chang-Cheng, A. Verma, V. M. Rotello. Engineering the nanoparticle-biomacromolecule interface. *Soft. Matter.*, 2, 2006, 190.
58. M. Kahl, E. Voges. Analysis of plasmon resonance and surface-enhanced Raman scattering on periodic silver structures. *Phys. Rev. B*, 61, 2000, 14078.
59. S. Garoff, D. A. Weitz, M. S. Alvarez, J. I. Gersen. Electrodynamics at rough metal surfaces: Photochemistry and luminescence of adsorbates near metal island films. *J. Chem. Phys.*, 81, 1984, 5189.
60. X. M. Xua, J. I. Gersten, A. Nitzan. Theory of energy transfer between molecules near solid stated. *J. Chem. Phys.*, 83, 1985, 3650.
61. R. Aroca, U. Guhathakurta-Ghosh, R. O. Loufty, Y. Nagao. Surface enhanced spectroscopy o Langmuir- Blodgett films of N-octyl -N'-isobutyl-3,9,10 pelylene- bis(dicarboximide). *Spectrochim. Acta, Part A: Mol. and Biomolec. Spec.*, 46A, 1990, 717.
62. S. Link, M. A. El-Sayed. Spectral properties and relaxation of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *J. Phys. Chem. B*, 103, 1999, 8410.
63. K. Aslan, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes. Rapid deposition of triangular silver nanoplates on planar surfaces: application to metal-enhanced fluorescence. *J. Phys. Chem. B*, 109, 2005, 6247.
64. D. Geddes Chris, I. Gryczynski, J. Malicka, Z. Gryczynski. Metal-enhanced fluorescence: potential applications in HTS. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 6, 2003, 109.
65. Z. Liu, S. H. J. Mei, J. D. Brennan, Y. Li. Assemblage of signaling DNA enzymes with intriguing metal-ion specificities and pH dependences. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2003, 7539.
66. S. Ekgasit, G. Stengel, W. Knoll. Concentration of dye-labeled nucleotides incorporated into DNA determined by surface plasmon resonance-surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Anal. Chem.*, 76, 2004, 4747.
67. D. Mandal, T. Tahara, S. R. Meech. Excited-state dynamics in the green fluorescent protein chromophore. *J. Phys. Chem. B*, 108, 2004, 1102.
68. G. Yao, W. Tan. Molecular-beacon-based array for sensitive DNA analysis. *Anal. Biochem.*, 331, 2004, 216.

69. N. Leopold, B. Lendl. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *J. Phys. Chem. B*, 107, 2003, 5723.
70. P. D. F. Siqueira, G. Wenz, P. Schunk, T. Schimmel. An improved method for the assembly of Amino-terminated monolayers on SiO<sub>2</sub> and the vapor deposition of gold layers. *Langmuir*, 15, 1999, 4520.
71. S. Kramer, R. R. Fuieler, C. B. Gorman. Scanning probe lithography using self-assembled monolayers. *Chem. Rev.*, 103, 2003, 4367.
72. A. Roucoux, J. Schulz, H. Patin. Reduced transition metal colloids: A novel family of reusable catalysts? *Chem. Rev.*, 102, 2002, 3757.
73. E. Graton, J. M. Beechem, W. W. Mantulin. Globals Unlimited Software. 1990
74. P. A. Leyton. Construcción de superficies amplificadoras del efecto raman como soporte para la identificación de trasaz de contaminantes medioambientales. *Departamento de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas*. 2005:120
75. D. L. Feldheim, C. A. Foss. *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Application*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002.
76. P. Laven. Absorption and scattering of light by small particles. 2005
77. D. Ross. Plasmon Absorption for Nanoparticles. 2002
78. R. F. Kubin, A. N. Fletcher. Fluorescence quantum yields of some rodamine dyes. *J. Luminescence*, 27, 1982, 455.
79. S. Pan, Z. Wang, L. J. Rothberg. Enhancement of adsorbed dye monolayer fluorescence by a silver nanoparticle overlayer. *J. Phys. Chem. B*, 110, 2006, 17383.
80. J. R. Lakowicz, J. Zhang, E. Matveeva, I. Gryczynski, Z. Leonenko. Metal-enhanced fluoroimmunoassay on a silver film by vapor deposition. *J. Phys. Chem. B*, 109, 2005, 7969.
81. W. E. Doering, S. Nie. Single-molecule and single-nanoparticle SERS: examining the roles of surface active sites and chemical enhancement. *J. Phys. Chem. B*, 106, 2002, 311.
82. L. Lu, A. Kobayashi, K. Tawa, Y. Ozaki. Silver nanoplates with special shapes: controlled synthesis and their surface plasmon resonance and surface-enhanced raman scattering properties. *Chem. Mater.*, 18, 2006, 4894.
83. D. J. Maxwell, S. R. Emory, S. Nie. Nanostructured thin-film materials with surface-enhanced optical properties. *Chem. Mater.*, 13, 2001, 1082.

84. C. J. Orendorff, C. J. Murphy. Quantitation of metal content in the silver-assisted growth of gold nanorods. *J. Phys. Chem. B*, 110, 2006, 3990.
85. F. del Monte, D. Levy. Formation of fluorescent rhodamine B J-Dimers in sol gel glasses induced by the adsorption geometry on the silica surface. *J. Phys. Chem. B*, 102, 1998, 8036.
86. Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: Focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures. *Chem. Rev.*, 103, 2003, 3899.
87. S. J. Strickler, R. A. Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *J. Chem. Phys.*, 37, 1962, 814.
88. G. Pistolis, S. Boyatzis, M. Chatzichristidi, P. Argitis. Highly efficient bicolor (Green-Blue) fluorescence imaging in polymeric films. *Chem. Mater.*, 14, 2002, 790.
89. G. Pistolis, A. Malliaris. Simultaneous double probing of the microenvironment in colloidal systems and molecular assemblies by DPH derivatives. *Langmuir*, 13, 1997, 1457.
90. Y. Sonoda, Y. Kawanishi, M. Goto, S. Hayashi, Y. Yoshida, N. Tanigaki, K. Yase. Fluorescence spectra for the microcrystals and thin films of trans,trans,trans-1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrienes. *J. Phys. Chem. B*, 107, 2003, 3376.
91. C. T. Lin, H. W. Guan, R. K. McCoy, C. W. Spangler. Dual fluorescence of p-disubstituted 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrienes: Evidence of a twisted intramolecular charge transfer state. *J. Phys. Chem.*, 93, 1988, 39.
92. R. A. Keller, W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, J. H. Werner. Single molecule fluorescence spectroscopy at ambient temperature. *Chem. Rev.*, 99, 1999, 2929.
93. M. Kawasaki, S. Mine. Novel lasing action in dye-doped polymer films coated on large pseudotabular Ag islands. *J. Phys. Chem. B (Letters)*, 110, 2006, 15052.

## **11.0 Anexos**

# I Estudios Vibracional

## Cálculos y Asignación de Bandas Vibracionales

### DPH (Difenilhexatrieno)

Los espectros vibracionales de DPH fueron registrados y asignados. El sistema molecular trans-DPH pertenece al grupo puntual  $C_{2h}$  con 34 átomos ( $C_{18}H_{16}$ ) y 96 vibraciones fundamentales (ver figura 6.1). La representación irreducible es,

$$\Gamma_{\text{vib}} = 33a_g + 15b_g + 16a_u + 32b_u$$

La molécula tiene un centro de simetría y las reglas de selección describen una mutua exclusión de las bandas activas en Raman e infrarrojas, y se espera que los modos  $a_g$  predominen en el espectro Raman. Los espectros Raman e infrarrojo del sólido para DPH se muestran en la figura 1.2. Aunque los espectros están en el estado sólido, donde podría existir cierta desviación del modelo simétrico, se observa la regla de exclusión mutua para las bandas Raman e IR. Las principales bandas observadas en ambos espectros corresponden a vibraciones del anillo y la zona central de la molécula (hexatrieno).

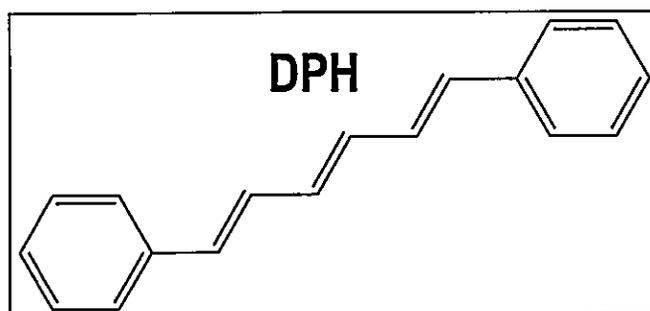


Figura 1.1

Estructura del DPH

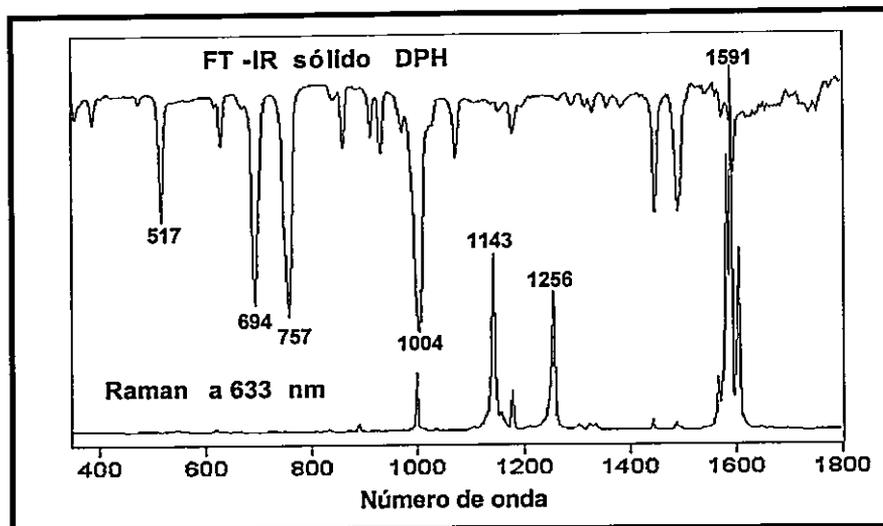


Figura 1.2 Espectros Raman e Infrarrojo de DPH

La interpretación de los espectros Raman fue realizado a partir del espectro calculado que se muestra en la figura 1.3. Además en la tabla 1.1 se muestran las frecuencias características, intensidades calculadas, intensidades observadas y asignaciones.

Existe un buen acuerdo entre el espectro calculado a través de DFT (B3LYP/6-31G(d)) y el espectro experimental.

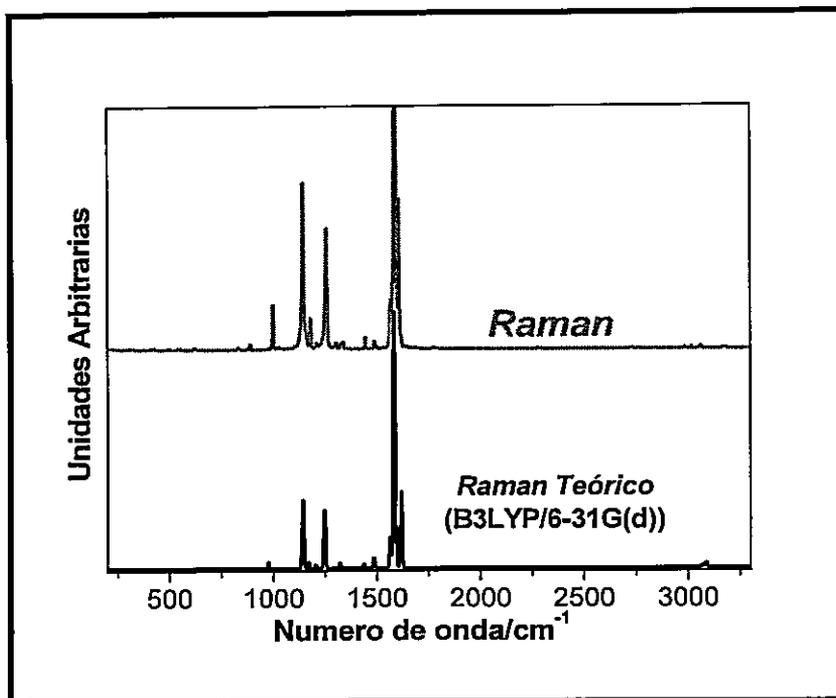


Figura 1.3 Espectros Raman experimental y teórico de DPH

Las bandas características son los modos de estiramiento C=C para el anillo y el enlace central a 1605, 1592, 1585 y 1567  $\text{cm}^{-1}$ . Las vibraciones a 1592  $\text{cm}^{-1}$  y 1585  $\text{cm}^{-1}$  son la que tienen un mayor contribución y corresponden al hexatrieno central. Además las bandas de combinación que presenta el anillo son muy fuertes y están por debajo de 1500  $\text{cm}^{-1}$ ; estas bandas se observan por la combinación de 1592 + 1143 = 2735  $\text{cm}^{-1}$  y 1592 + 1257 = 2849  $\text{cm}^{-1}$ . La asignación de cada una de las bandas de combinación es; 1143  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a los modos normales deformación del anillo y C-H, mientras que la banda a 1257  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a un estiramiento C-C del hexatrieno central (ver figura 1.4).

Además algunas de las bandas observadas a frecuencias altas como 3061  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al estiramiento C-H, vibración característica del anillo fenilo, con un ancho de banda en el máximo (FWHM) de 10.7  $\text{cm}^{-1}$ . En la misma región espectral, la banda observada a 3177  $\text{cm}^{-1}$  podría ser un sobretono de la banda a 1592  $\text{cm}^{-1}$  (la banda más intensa del espectro Raman).

La respiración del anillo es una frecuencia característica de Raman siempre que se encuentre un anillo fenilo, y se considera en  $998\text{ cm}^{-1}$ ; la combinación correspondiente se observa en  $1592 + 998 = 2590\text{ cm}^{-1}$ , apoyando la asignación. La banda débil en  $886\text{ cm}^{-1}$  da lugar a una sobretono a  $1779\text{ cm}^{-1}$  y se puede asignar a un modo fenilo del anillo con una importante contribución de la flexión C-H. Todas las bandas Raman observadas con una cierta intensidad relativa se pueden asignar a modos totalmente simétricos  $a_g$ .

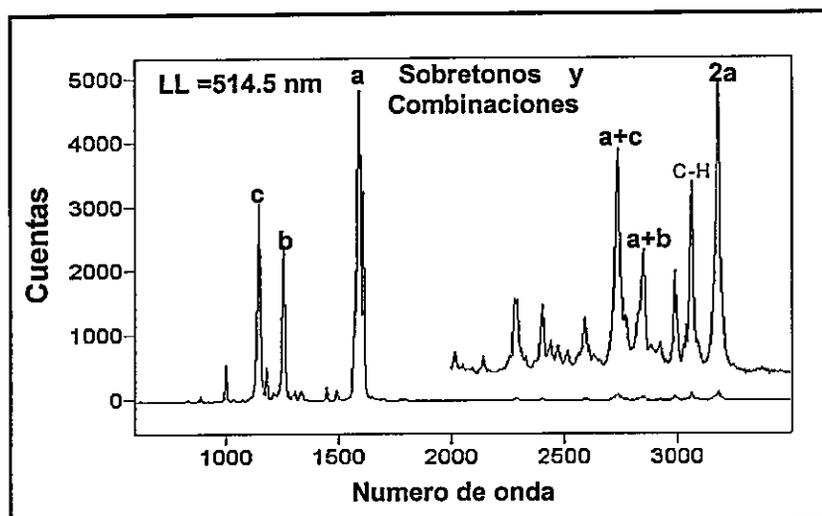


Figura 1.4 Sobretonos y Combinaciones de DPH

Tabla 1.1 Bandas vibracionales en número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para DPH. Cálculo de intensidades Raman en  $\text{Å}^4/\text{amu}$ .

Simetría	Calculados		Experimental		Asignación
	Frecuencia	Intensidad	Frecuencia	Intensidad Relativa	
$b_g$	35	2		0.00	Def. fuera del plano
$a_g$	91	2		0.00	Def. en el plano
$b_g$	113	15		0.00	Def. enlace central
$a_g$	181	1	188	0.20	Def. enlace central
$b_g$	248	4		0.00	Def. enlace central
$b_g$	319	4	316	0.43	Def. en el plano
$a_g$	329	1		0.00	Deformación del anillo
$b_g$	397	1	486	0.35	Deformación del anillo
$b_g$	497	2	502	0.37	Deformación del anillo
$a_g$	541	5	547	0.16	Deformación del anillo
$a_g$	603	5	590	0.40	C-H aleteo
$a_g$	611	40	620	0.31	C-H aleteo

$b_g$	675	10	659	0.43	C-H aleteo
$b_g$	733	3	723	0.27	C-H aleteo
$b_g$	809	10	809	0.25	Def. anillo fuera del plano
$a_g$	817	20		0.00	Def anillo + C-H aleteo
$b_g$	821	7	829	0.27	Def anillo + C-H aleteo
$b_g$	874	50	863	1.20	Def anillo + C-H aleteo
$b_g$	891	70	886	0.27	Def anillo + C-H aleteo
$b_g$	926	1	936	0.26	Def anillo + C-H aleteo
$b_g$	951	5	954	1.12	Deformación del anillo
$b_g$	966	6	975	1.00	C-H aleteo
$a_g$	975	1100	998	2.57	Respiración del anillo
$a_g$	1018	130	1028	0.21	C-C estiramiento
$a_g$	1069	90	1070	0.13	Def anillo + C-H estiramiento
$a_g$	1142	11890	1143	8.71	Def anillo + C-H estiramiento
$a_g$	1147	260		0.00	C-C estiramiento
$a_g$	1170	1130	1179	2.96	C-C estiramiento
$a_g$	1204	610	1210	1.19	C-C estiramiento
$a_g$	1247	10290	1250	11.45	C-C estiramiento
$a_g$	1287	3		0.00	C-C estiramiento
$a_g$	1295	180	1297	1.12	C=C estiramiento
$a_g$	1317	200	1301	0.98	C=C estiramiento
$a_g$	1322	830	1326	1.26	C=C estiramiento
$a_g$	1437	770	1444	1.19	C=C estiramiento
$a_g$	1485	1800	1489	1.29	C=C estiramiento
$a_g$	1564	5530	1569	4.17	C=C estiramiento
$a_g$	1582	45430	1592	100.00	C=C estiramiento
$a_g$	1594	2190	1585	83.44	C=C estiramiento
$a_g$	1616	13440	1605	4.43	C=C estiramiento
$a_g$	3020	10	2993	0.72	C-H estiramiento
$a_g$	3026	200	3023	0.70	C-H estiramiento
$a_g$	3040	40	3036	0.42	C-H estiramiento
$a_g$	3055	100	3059	0.48	C-H estiramiento
$a_g$	3061	200	3062	0.55	C-H estiramiento
$a_g$	3071	400	3070	0.73	C-H estiramiento
$a_g$	3080	300	3083	0.46	C-H estiramiento
$a_g$	3088	800	3090	0.61	C-H estiramiento

## DM-DPH (Dimetil-difenilhexatrieno)

Los espectros vibracionales de DM-DPH fueron registrados y asignados. El sistema molecular trans-DM-DPH pertenece al grupo puntual  $C_s$  con 40 átomos ( $C_{20}H_{19}N$ ) y 120 vibraciones fundamentales (figura 6.5). La representación irreducible es,

$$\Gamma_{\text{vib}} = 81A' + 39A''$$

La molécula pierde el centro de simetría con el grupo funcional  $(CH_3)_2N-$ , por ello las reglas de selección describen que las bandas activas en Raman son también activas en infrarrojos y viceversa. Los espectros Raman e infrarrojo del sólido para DPH se muestran en la figura 1.6. Aunque la molécula ha perdido la simetría  $C_{2h}$  las principales bandas observadas en ambos espectros corresponden a vibraciones del anillo y de la zona central de la molécula (hexatrieno), similar a DPH.

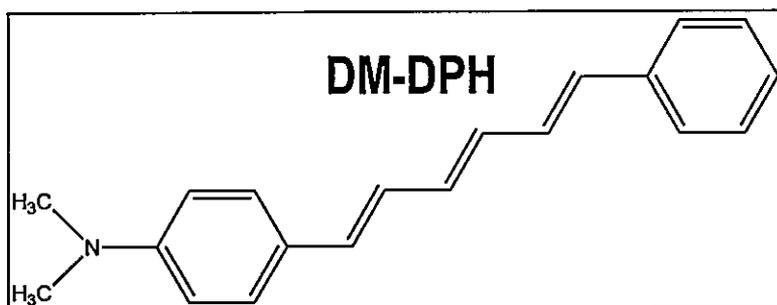


Figura 1.5

Estructura de DM-DPH

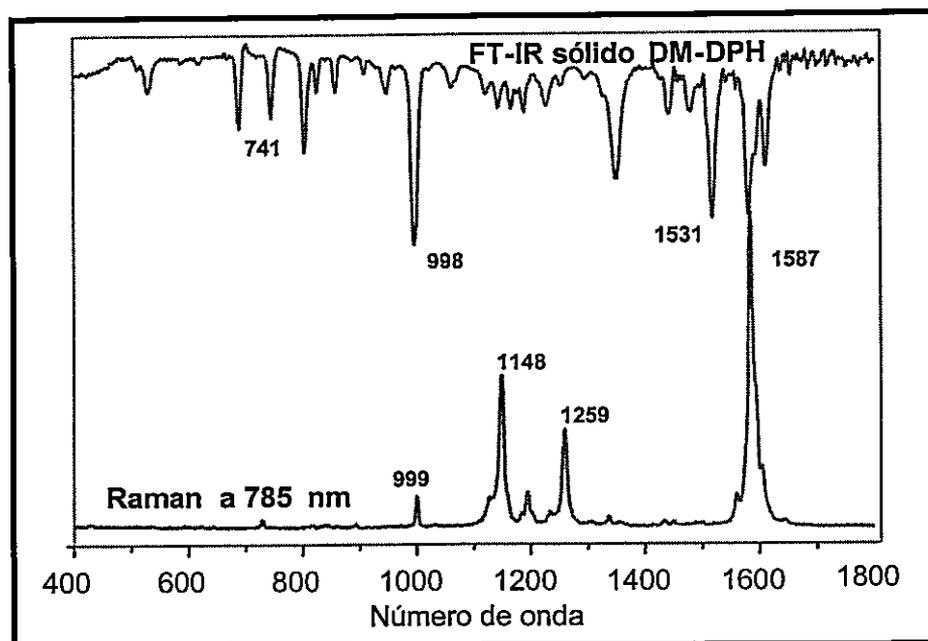


Figura 1.6 Espectros Raman e Infrarrojo de DM-DPH

La interpretación de los espectros Raman fue obtenido a través del espectro calculado que se muestra en la figura 1.7. Además en la tabla 1.2 se muestran las frecuencias características, intensidades calculadas, intensidades observadas y asignaciones. El acuerdo entre el cálculo DFT (B3LYP/6-31G (d)) y el espectro experimental es notable, a pesar que los espectros calculados se llevan a cabo en fase gas.

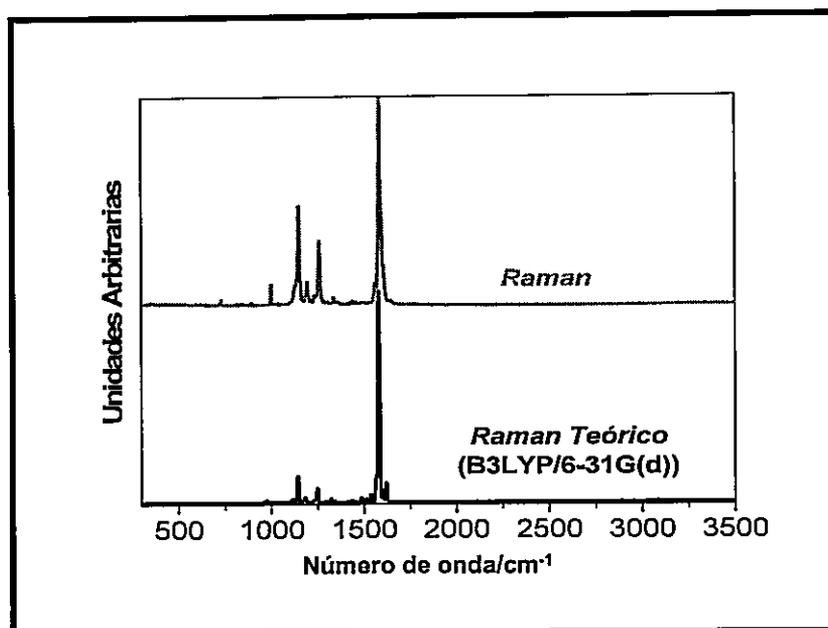


Figura 1.7 Espectros Raman experimental y teórico de DM-DPH

Las bandas características son los modos de estiramiento C=C para el anillo y el enlace central a 1605, 1593, 1585 y 1560  $\text{cm}^{-1}$ . Las vibraciones a 1593  $\text{cm}^{-1}$  y 1585  $\text{cm}^{-1}$  son la que tienen un mayor contribución y corresponden al hexatrieno central. Además las bandas de combinación que presenta el anillo son muy fuertes y están por debajo de 1500  $\text{cm}^{-1}$ ; estas bandas se observan por la combinación de 1585 + 1144 = 2729  $\text{cm}^{-1}$  y 1585 + 1255 = 2840  $\text{cm}^{-1}$ . La asignación de cada una de las bandas de combinación es; 1144  $\text{cm}^{-1}$  modos normales de estiramiento C-C del hexatrieno, mientras que la banda a 1255  $\text{cm}^{-1}$  se podría asignar al estiramiento C=C del hexatrieno. Además la banda que aparece con una intensidad débil a 1324  $\text{cm}^{-1}$  es característica para este sistema molecular, ya que corresponde al estiramiento del enlace C-N (ver figura 1.6)

Por otra parte las bandas observadas a frecuencias altas como 3083  $\text{cm}^{-1}$  y 3064  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al estiramiento C-H, vibración característica del anillo fenilo, con un ancho de banda aproximado de 13.7  $\text{cm}^{-1}$  para ambas. En la misma región espectral, la banda observada a 3170  $\text{cm}^{-1}$  podría ser un sobretono de la banda 1585  $\text{cm}^{-1}$  (la banda más intensa de Raman) (ver figura 1.8).

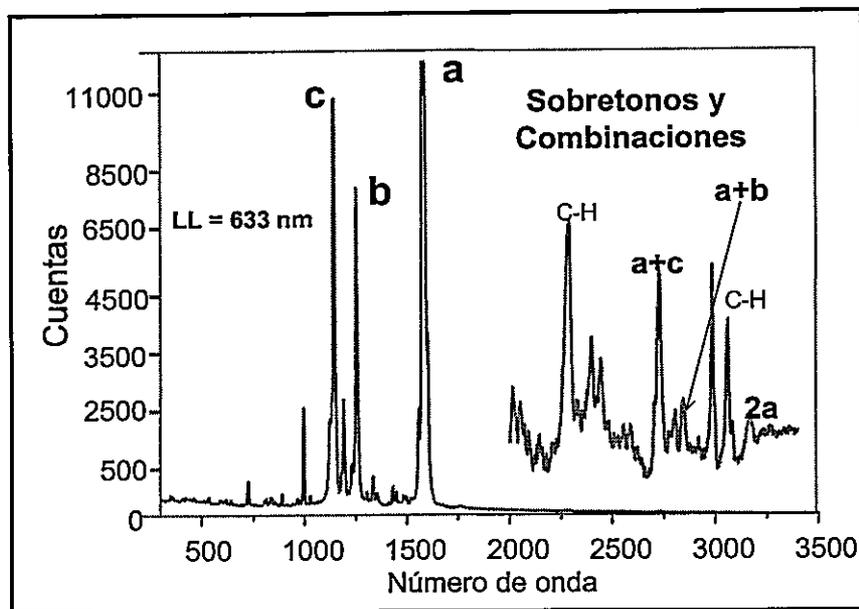


Figura 1.8 Sobretonos y combinaciones de DM-DPH

Tabla 1.2 Bandas vibracionales en número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para DM-DPH. Cálculo de intensidades Raman en  $\text{Å}^4/\text{amu}$ .

Simetría	Calculados		Experimental		Asignación
	Frecuencia	Intensidad	Frecuencia	Intensidad Relativa	
a	18	0		0.00	Def. fuera del plano
a	25	1		0.00	Def. en el plano
a	26	0		0.00	Def. enlace central
a	40	1		0.00	Def. enlace central
a	69	10		0.00	Def. enlace central
a	74	5		0.00	Def. en el plano
a	77	2		0.00	Deformación del anillo
a	102	12		0.00	Deformación del anillo
a	121	13	134	1.00	Deformación del anillo
a	149	1	155	1.20	Deformación del anillo
a	157	1		0.00	C-H aleteo
a	173	1	182	0.91	C-H aleteo
a	200	0		0.00	C-H aleteo
a	207	17	220	1.40	C-H aleteo
a	247	14	253	1.25	Def. anillo fuera del plano
a	261	1		0.00	Def anillo + C-H aleteo
a	295	11		0.27	Def anillo + C-H aleteo
a	330	1		1.20	Def anillo + C-H aleteo
a	332	3	350	0.27	Def anillo + C-H aleteo
a	338	2		0.26	Def anillo + C-H aleteo
a	397	10	407	1.12	Deformación del anillo
a	399	0		0.00	C-H aleteo

a	414	6	423	0.00	Def anillo + C-H aleteo
a	431	11	438	1.21	Def anillo + C-H aleteo
a	447	1		0.00	Def anillo + C-H aleteo
a	482	1	460	0.71	Def anillo + C-H aleteo
a	502	1	491	0.20	Def anillo + C-H aleteo
a	517	1	507	0.96	Deformación del anillo
a	529	44	532	3.19	Def anillo + C-H aleteo
a	579	1	590	0.45	Def anillo + C-H aleteo
a	609	2		0.10	Def del anillo
a	611	19	617	2.12	Def del anillo
a	632	22	640	4.98	Def del anillo
a	676	4	679	0.26	C-H aleteo
a	705	3	689	0.19	Def del anillo
a	713	165	725	5.29	Anillo respiración
a	736	2	747	0.17	C-H aleteo
a	779	6	761	0.20	C-H aleteo
a	791	7	777	1.23	C-H aleteo
a	812	6	805	1.24	C-H aleteo
a	820	12	812	0.67	C-H aleteo
a	820	8			C-C estiramiento
a	837	37	835	2.21	C-C estiramiento
a	848	0	841	0.48	C-H aleteo
a	873	71	856	0.55	C-H aleteo
a	888	41	889	0.73	C-H aleteo
a	904	1			C-H aleteo
a	908	11	910	0.99	C-H aleteo
a	921	5			C-H aleteo
a	925	1			C-H aleteo
a	933	59	931	2.11	CH3-N estiramiento
a	951	3	949	1.00	C-H aleteo
a	964	5	966	1.23	C-H aleteo
a	975	915			Def del anillo
a	985	24	986	3.45	Def del anillo
a	1005	2	996	10.88	C-H aleteo
a	1018	91	1028	1.35	Def del anillo
a	1050	4	1064	2.20	Def del anillo
a	1069	61	1074	3.20	C=C estiramiento
a	1108	742			CH3-N estiramiento
a	1109	17			CH3-N estiramiento
a	1117	1175	1125	10.57	C=C estiramiento
a	1139	907			C-C estiramiento
a	1143	9737	1145	48.42	C-C estiramiento
a	1146	91			C=C estiramiento
a	1163	19			CH3-N estiramiento
a	1170	651			C=C estiramiento
a	1182	1955	1180	3.20	C=C estiramiento
a	1192	239	1192	2.30	C=C estiramiento
a	1209	191	1200	4.90	C-C estiramiento
a	1226	668			C-C estiramiento
a	1234	1011	1231	1.10	C-C estiramiento
a	1249	5661	1255	5.40	C=C estiramiento
a	1287	7			C=C estiramiento

a	1291	39			C=C estiramiento
a	1295	437			C=C estiramiento
a	1302	16	1303	31.40	C=C estiramiento
a	1319	311	1318	0.15	C=C estiramiento
a	1321	1195			C-C estiramiento
a	1325	63	1334	4.85	C=C estiramiento
a	1342	524		3.60	C-N estiramiento
a	1357	8	1353	1.25	C-C estiramiento
a	1412	333	1412	1.25	C-H aleteo
a	1431	771			C=C estiramiento
a	1440	462	1446	1.35	C=C estiramiento
a	1453	16			C=C estiramiento
a	1456	23			C-H aleteo
a	1461	109	1465	1.20	C-H aleteo
a	1485	1083	1485	1.34	C=C estiramiento
a	1486	691			C-H aleteo
a	1500	526	1497	2.00	C-H aleteo
a	1514	1367			C-N estiramiento
a	1538	3010	1521	2.30	C=C estiramiento
a	1565	9564	1560	12.90	C=C estiramiento
a	1579	83501	1586	100.00	C=C estiramiento
a	1591	311	1593	30.20	C=C estiramiento
a	1600	4950			C=C estiramiento
a	1619	7531	1605	20.00	C=C estiramiento
a	1632	20	1625	3.24	C=C estiramiento
a	2883	165			C-H estiramiento
a	2890	252	2915	0.28	C-H estiramiento
a	2953	112			C-H estiramiento
a	2954	93	2986	0.34	C-H estiramiento
a	3016	18			C-H estiramiento
a	3020	79			C-H estiramiento
a	3020	6			C-H estiramiento
a	3022	21			C-H estiramiento
a	3024	80			C-H estiramiento
a	3032	305			C-H estiramiento
a	3037	43			C-H estiramiento
a	3039	8			C-H estiramiento
a	3052	63			C-H estiramiento
a	3053	120			C-H estiramiento
a	3059	92	3062	0.26	C-H estiramiento
a	3069	196			C-H estiramiento
a	3071	50			C-H estiramiento
a	3079	205			C-H estiramiento
a	3086	473	3083	0.35	C-H estiramiento
a	3103	98			C-H estiramiento
a	3104	108			C-H estiramiento

## DM-PTC (Dimetil-fenilhexatrienona)

Los espectros vibracionales de DM-PTC fueron registrados y asignados. El sistema molecular trans-DM-PTC pertenece al grupo puntual  $C_s$  con 36 átomos ( $C_{16}H_{19}O$ ) y 105 vibraciones fundamentales (ver figura 6.9). La representación irreducible es,

$$\Gamma_{\text{vib}} = 71A' + 34A''$$

En este sistema molecular las bandas activas en Raman son activas en infrarrojo y viceversa. Los espectros Raman e infrarrojo del sólido para DM-PTC se muestran en la figura 1.10. Las principales bandas observadas corresponden a vibraciones del anillo y de la zona central de la molécula (hexatrieno), similar al DPH y al DM-DPH.

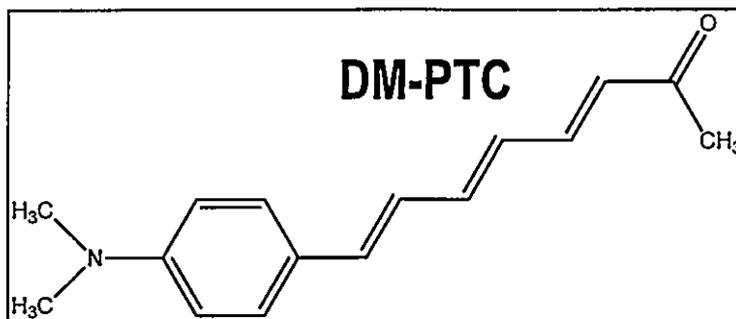


Figura 1.9

Estructura de DM-PTC

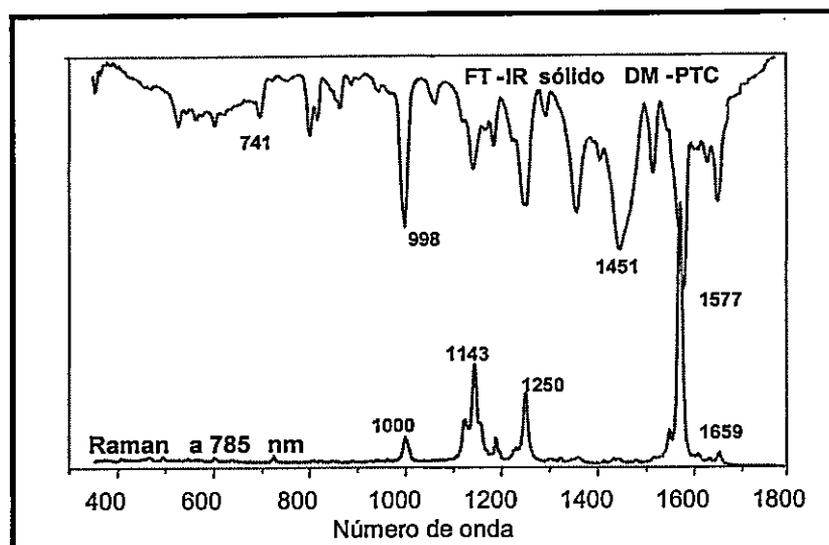


Figura 1.10 Espectros Raman e Infrarrojo de DM-DPH

La interpretación de los espectros Raman fue proporcionada a partir del espectro calculado que se muestra en la figura 1.11. Además en la tabla 1.3 se muestran las frecuencias características, intensidades calculadas, intensidades observadas y asignaciones. El acuerdo entre el cálculo DFT (B3LYP/6-31G (d)) y el espectro experimental es notable, a pesar que los espectros calculados se llevan a cabo en fase gas.

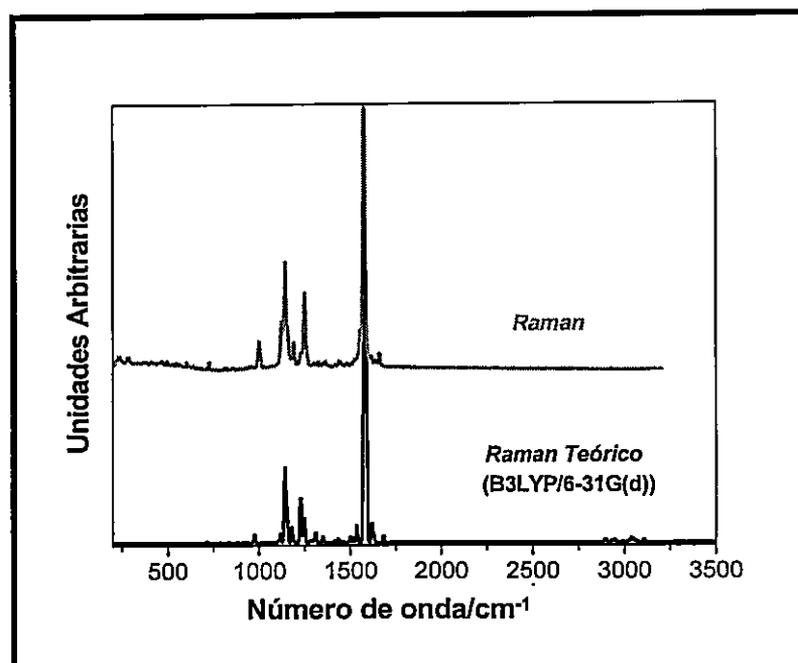


Figura 1.11 Espectros Raman experimental y teórico de DM-PTC

Las bandas características son los modos de estiramiento C=C para el anillo y el enlace central a 1577, 1554 y 1124  $\text{cm}^{-1}$ . Las vibraciones a 1577  $\text{cm}^{-1}$  y 1554  $\text{cm}^{-1}$  son la que tienen un mayor contribución y corresponde al hexatrieno central. Además las bandas a 1143, 1154 y 1250  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a los modos normales C-C del hexatrieno. Además se observa una vibración de estiramiento para el enlace C=O a 1656  $\text{cm}^{-1}$ .

En la región alta del espectro se observan algunas vibraciones asociadas al estiramiento C-H (2930, 3050 y 3086  $\text{cm}^{-1}$ ).

Finalmente, la intensidad de sobretonos y combinaciones son bajas para este sistema molecular y no fueron detectadas en el espectro Raman.

Tabla 1.3 Bandas vibracionales en número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para DM-PTC. Cálculo de intensidades Raman en  $\text{Å}^4/\text{amu}$ .

Simetría	Calculados		Experimental		Asignación
	Frecuencia	Intensidad	Frecuencia	Intensidad Relativa	
a	20	0		0.00	Def. fuera del plano
a	31	1		0.00	Def. en el plano
a	32	3		0.00	Def. enlace central
a	43	5		0.00	Def. enlace central
a	60	4		0.00	Def. enlace central
a	69	2		0.00	Def. en el plano
a	92	3		0.00	Deformación del anillo
a	112	3		0.00	Deformación del anillo
a	121	0		0.00	Deformación del anillo
a	148	7		0.00	Deformación del anillo
a	167	8		0.00	C-H aleteo
a	173	2		0.00	C-H aleteo
a	190	5		0.00	C-H aleteo
a	203	1		0.00	C-H aleteo
a	229	5	235	8.13	Def. anillo fuera del plano
a	259	1		0.00	Def anillo + C-H aleteo
a	279	5	283	8.27	Def anillo + C-H aleteo
a	324	2	330	4.20	Def anillo + C-H aleteo
a	340	0			Def anillo + C-H aleteo
a	361	16	467	2.26	Def anillo + C-H aleteo
a	399	4	408	7.12	Deformación del anillo
a	417	3		0.00	C-H aleteo
a	438	10		0.00	Def. fuera del plano
a	452	46	453	7.21	Def. en el plano
a	483	21	495	7.80	Def. enlace central
a	517	3	528	0.71	Def. enlace central
a	534	2	528	1.20	Def. enlace central
a	554	5	545	2.96	Def. en el plano
a	557	2		0.00	Def. enlace central
a	590	9	603	3.45	Def. enlace central
a	631	17	638	1.10	Def anillo + C-H aleteo
a	706	2		0.00	C-C=C- deformación
a	714	131	726	8.98	Def anillo + C-H aleteo
a	779	6	766	1.26	C-C=C- deformación
a	790	11		0.00	C-C=C- deformación
a	792	5		0.00	Def anillo + C-H aleteo
a	812	2	808	1.17	C-C=C- deformación
a	833	47	825	1.20	Def del anillo
a	849	0		0.00	C-C=C- deformación
a	880	63	889	1.24	C-C=C- deformación
a	907	1		0.00	C-C=C- deformación
a	911	5		0.00	C-C=C- deformación
a	926	5	926	2.21	C-C=C- deformación
a	934	21	942	1.48	Def del anillo
a	970	1	964	1.55	C-H aleteo
a	975	750		0.00	C-H aleteo

a	984	16		0.00	C-C deformación
a	1008	2	1000	13.00	C-H aleteo
a	1017	5	1004	0.89	C-H aleteo
a	1049	4	1043	1.26	C-N estiramiento
a	1105	228		0.00	C-C estiramiento
a	1112	10		0.00	C-C estiramiento
a	1118	829	1124	21.23	C=C estiramiento
a	1142	6873	1143	41.18	C-C estiramiento
a	1153	2988	1156	20.45	C-C estiramiento
a	1164	26		10.88	C=C estiramiento
a	1179	1455		1.35	C-C estiramiento
a	1191	166	1188	2.20	C-C estiramiento
a	1225	2605	1230	31.20	C-C estiramiento
a	1230	2311		0.00	C-C estiramiento
a	1237	125		0.00	C=C estiramiento
a	1248	2307	1250	10.57	C-C estiramiento
a	1280	185		0.00	C-C estiramiento
a	1290	23		0.00	C-C estiramiento
a	1295	253		0.00	C-C estiramiento
a	1310	925	1304	1.26	C=C estiramiento
a	1327	57	1325	2.20	C=C estiramiento
a	1348	468		0.00	C-N estiramiento
a	1350	72		0.00	C=C estiramiento
a	1356	8	1361	1.20	C-C estiramiento
a	1412	154	1417	2.25	C-H aleteo
a	1433	351	1438	1.10	C=C estiramiento
a	1444	11	1446	5.40	C-H aleteo
a	1451	11			C-H aleteo
a	1452	34			C-H aleteo
a	1455	38			C-H aleteo
a	1460	76		0.00	C-H aleteo
a	1486	45	1484	0.15	C-H aleteo
a	1499	545			C-C estiramiento
a	1516	430	1522	4.85	C=C estiramiento
a	1535	1574	1554	17.27	C=C estiramiento
a	1574	26676	1577	100.00	C=C estiramiento
a	1586	19376		0.00	C=C estiramiento
a	1617	1771	1613	8.20	C=C estiramiento
a	1627	647	1638	1.35	C=C estiramiento
a	1682	611	1659	10.23	C=O estiramiento
a	2892	158		0.00	C-H estiramiento
a	2899	222		0.00	C-H estiramiento
a	2934	187	2930	3.00	C-H estiramiento
a	2946	127		0.00	C-H estiramiento
a	2948	93		0.00	C-H estiramiento
a	2991	33		0.00	C-H estiramiento
a	3018	14		0.00	C-H estiramiento
a	3021	99		0.00	C-H estiramiento
a	3024	6		0.00	C-H estiramiento
a	3033	85		0.00	C-H estiramiento
a	3037	267		0.00	C-H estiramiento
a	3040	66		0.00	C-H estiramiento

a	3044	126		0.00	C-H estiramiento
a	3045	113	3050	1.00	C-H estiramiento
a	3056	116		0.00	C-H estiramiento
a	3059	89		0.00	C-H estiramiento
a	3072	39	3086	0.34	C-H estiramiento
a	3105	78		0.00	C-H estiramiento
a	3106	172		0.00	C-H estiramiento

## II Caracterización Uv-visible y de emisión para fenil-trienos

La caracterización de estos sistemas moleculares se llevó a cabo en diferentes solventes. Para cada sistema molecular se registró el espectro de absorción y emisión, además se determinaron los rendimientos cuánticos en solución. En la tabla 2.1 se presentan estas propiedades para los tres sistemas moleculares propuestos.

Tabla 2.1 Propiedades espectrales de absorción y emisión de los fenil-trienos

Molécula	Máximo de absorción (cm <sup>-1</sup> )	Máximo de emisión (cm <sup>-1</sup> )	Corrimientos de Stokes (cm <sup>-1</sup> )	Rendimientos cuánticos*
DPH				
Ciclohexano	27027	24710	2313	0.63 ± 0.02
Acetona	27040	24900	2140	0.58 ± 0.02
Ciclohexanol	27080	24820	2260	0.64 ± 0.04
Etanol	27040	24880	2160	0.64 ± 0.03
Glicerol	27040	24860	2180	0.70 ± 0.03
DM-DPH				
Ciclohexano	25000	23520	1480	0.11 ± 0.01
Acetona	24070	19390	4680	0.03 ± 0.01
Ciclohexanol	24570	21060	3510	0.20 ± 0.03
Etanol	24040	19050	4990	0.03 ± 0.01
Glicerol	24050	20980	3070	0.50 ± 0.01
DM-PTC				
Ciclohexano	25640	21740	3900	0.08 ± 0.01
Acetona	25700	16260	9440	0.03 ± 0.01
Ciclohexanol	25890	15740	10150	0.11 ± 0.01
Etanol	25760	14820	10940	0.03 ± 0.01
Glicerol	25660	15420	10240	0.20 ± 0.01

\*Respecto de sulfato de quinina en ácido sulfúrico

De acuerdo a los datos reportados en la tabla 2.1 podemos concluir que el cambio de polaridad del solvente tiene un importante efecto en los espectros de emisión de DM-DPH y DM-PTC, observándose en ambos casos corrimientos batocrómicos al pasar de ciclohexano a acetona. Esto indica que en el estado excitado las moléculas tienen mayor polaridad y que se estabiliza mejor con un solvente polar. Por otra parte DPH no presenta cambios importantes en sus espectros de emisión, al considerar los mismos solventes; esto indica que su estado excitado no presenta polaridad.

Además en los espectros de emisión para solventes de baja polaridad (ciclohexano), se observa un aumento de la estructura vibracional, que corresponde a estiramientos C=C del hexatrieno central (figura 2.1). También se observa que los solventes que forman puentes de hidrógeno como etanol, generan un corrimiento al rojo de los espectros de emisión; tal vez la formación de este enlace estabiliza el estado excitado.

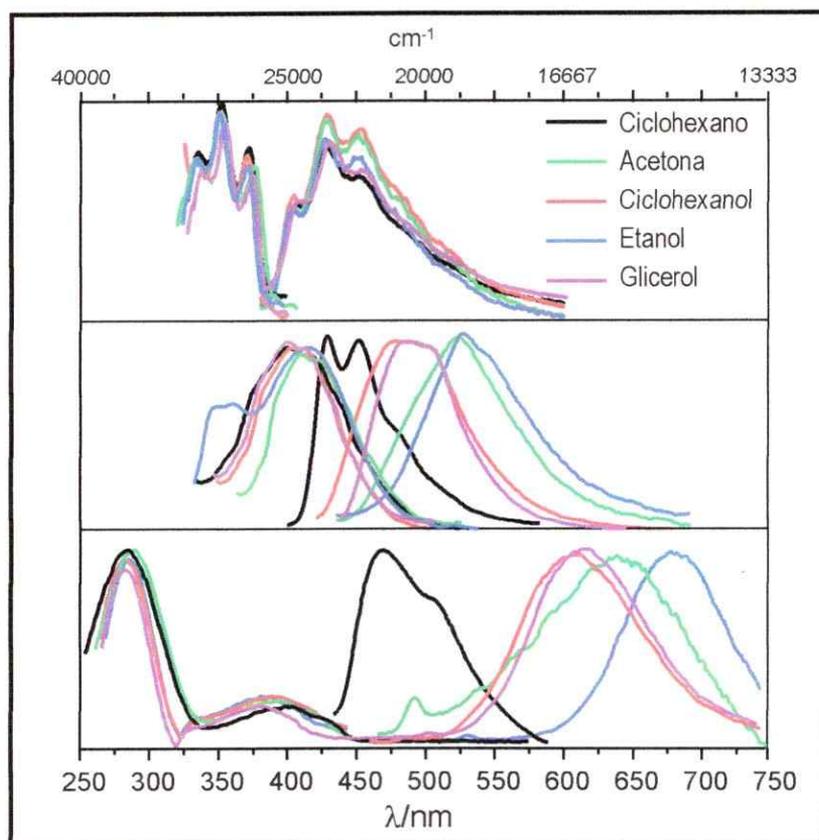


Figura 2.1 Espectros de absorción y emisión para fenil-trienos

La viscosidad del solvente también tiene un efecto importante en la emisión para DM-DPH y DM-PTC, observándose corrimientos al azul de los espectros de emisión al aumentar la viscosidad del solvente, mientras que DPH no presenta cambios significativos con el aumento de la viscosidad del medio.

También se observa que al aumentar la viscosidad del solvente aumento el rendimiento cuántico de emisión para todos los sistemas moleculares, pero en mayor grado para DM-DPH y DM-PTC. Esto se debe a que la estructura semi-congelada (ciclohexanol y glicerol) restringe muchos de los procesos que compiten con la fluorescencia. Por lo tanto, la anulación parcial de estos procesos tiene un impacto positivo en la emisión fluorescente de DM-DPH y DM-PTC.

### **III Optimización de variables para estudio de Fenil-trienos en polímero**

El estudio fue realizado en equipo de fluorescencia con arreglo óptico de iluminación frontal, previamente descrito en la sección 3.2.1, Capítulo 3.

Un esquema del arreglo óptico empleado se muestra en la figura 3.1. El ángulo de incidencia de la radiación de excitación fue medido considerando dos factores; el primero la emisión que llega al detector debe ser máxima y segundo la dispersión de la luz al detector debe ser la mínima. En la figura 3.2 se muestra la relación entre la emisión y dispersión y el ángulo de incidencia a la muestra. El estudio se realiza con DM-DPH depositado sobre un vidrio que tiene una capa polímero de 100 nm, la que fue aplicada a través de la metodología descrita en el capítulo 3. La longitud de onda de emisión fue medida a un valor de 520 nm y la longitud de onda de excitación de la muestra fue de 390 nm.

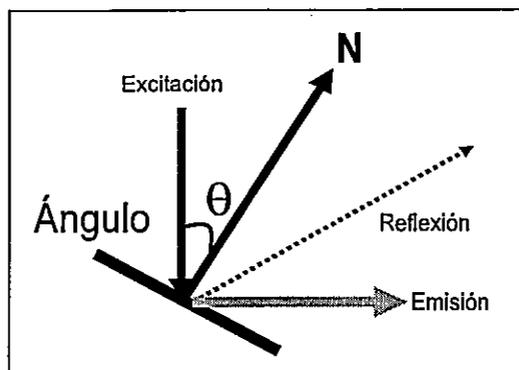


Figura 3.1 Esquema de determinación de ángulo de la muestra

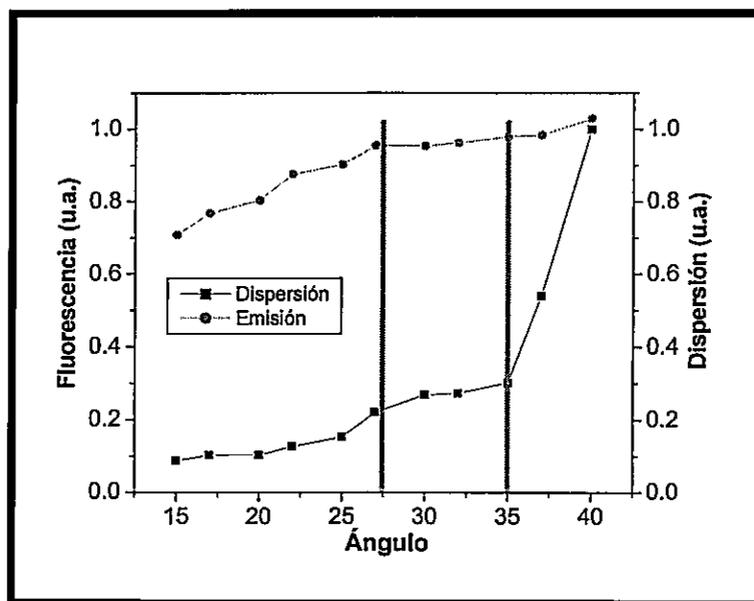


Figura 3.2 Relación emisión-dispersión con respecto al de incidencia para DM-DPH

Como se observa en la figura 3.2 los ángulos entre 30 y 33 grados, con respecto a la normal de la superficie, son los óptimos para realizar estudios de fluorescencia, ya que cumplen con la condición de mantener la dispersión en un valor relativamente bajo en relación a la fluorescencia. En adelante el ángulo que se utilizará para este tipo de experimentos es de  $30^{\circ}$ .

Los estudios consistió encontrar las condiciones óptimas de espesor de polímero que generara el mejor factor de amplificación de la fluorescencia. Para ello se trabajó con una superficie de Ag-hidroxilamina en la que se depósito diferentes espesores de polímero (Formvar).

Las muestras construidas fueron dos; una que esta compuesta por vidrio/polímero y la otra con vidrio/plata/polímero. La cantidad de moléculas depositadas en ambas muestra fue de 5  $\mu$ l ( $5 \times 10^{-4}$  M) en un área de aproximadamente  $2 \text{ cm}^2$ . El resultado de este estudio se muestra en las figuras 3.3, 3.4 y 3.5. Las frecuencias de excitación para cada una de las moléculas son 370 nm para DPH, 400 nm para DM-DPH y DM-PTC.

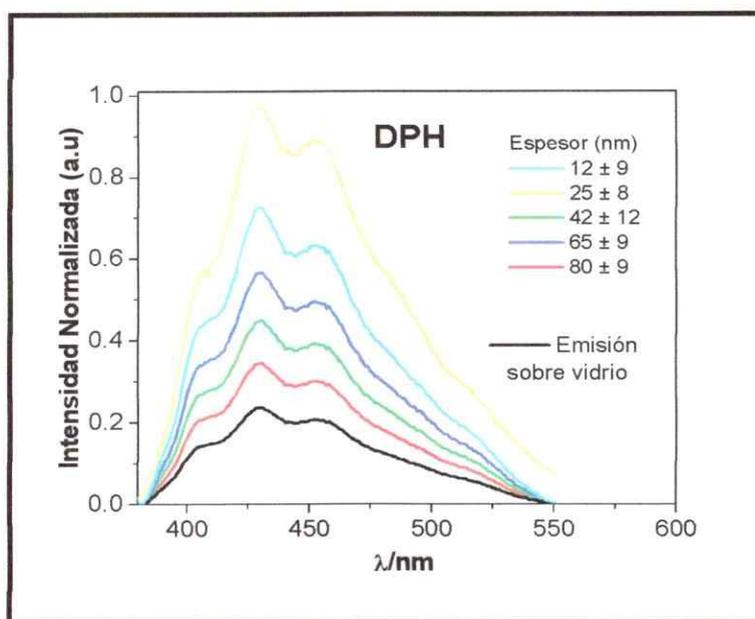


Figura 3.3 Espectro de emisión de DPH usando formvar como espaciador

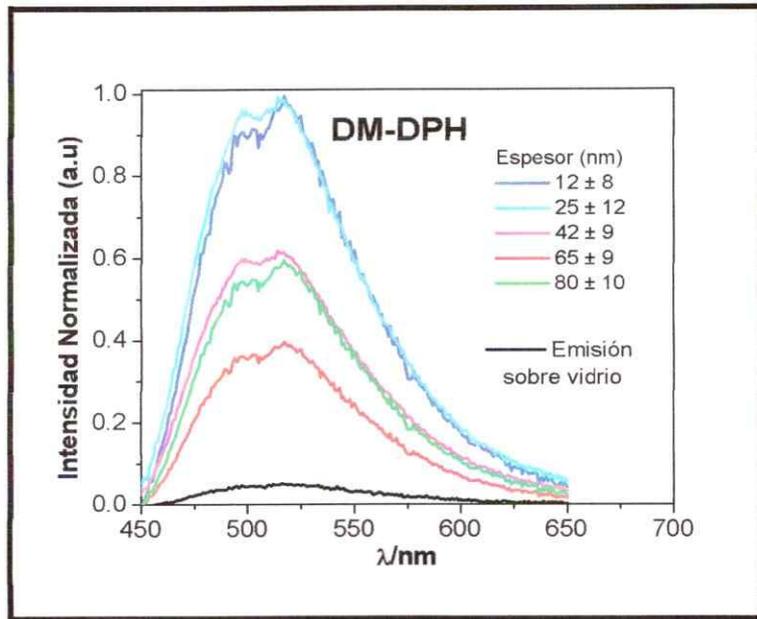


Figura 3.4 Espectro de emisión de DM-DPH usando formvar como espaciador

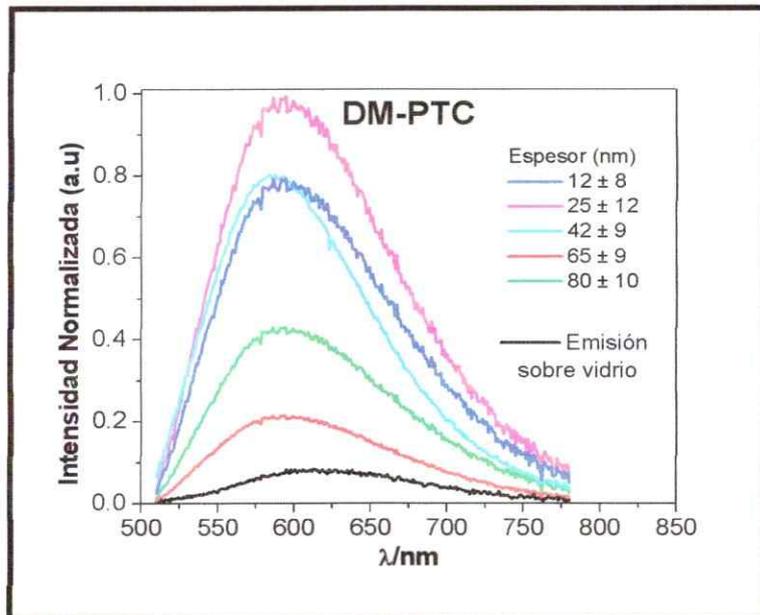


Figura 3.5 Espectro de emisión de DM-PTC usando formvar como espaciador

Si se observan en las figuras anteriores el cambio en el espesor de polímero sobre la superficie de plata, tiene un efecto en la emisión amplificada de los sistemas moleculares, obteniendo una amplificación máxima cuando el espesor de polímero es de 25 a 30 nm. Esto se ve con mayor claridad en las figuras 3.4, 3.5 y 3.6 donde se relacionan el factor de amplificación y el espesor de polímero. El valor de factor de amplificación fue medido una longitud de onda; 430 nm para DPH, 520 nm para DM-DPH y 600 nm para DM-PTC. Las frecuencias de excitación de las muestras son 370 nm para DPH, 400 nm para DM-DPH y DM-PTC.

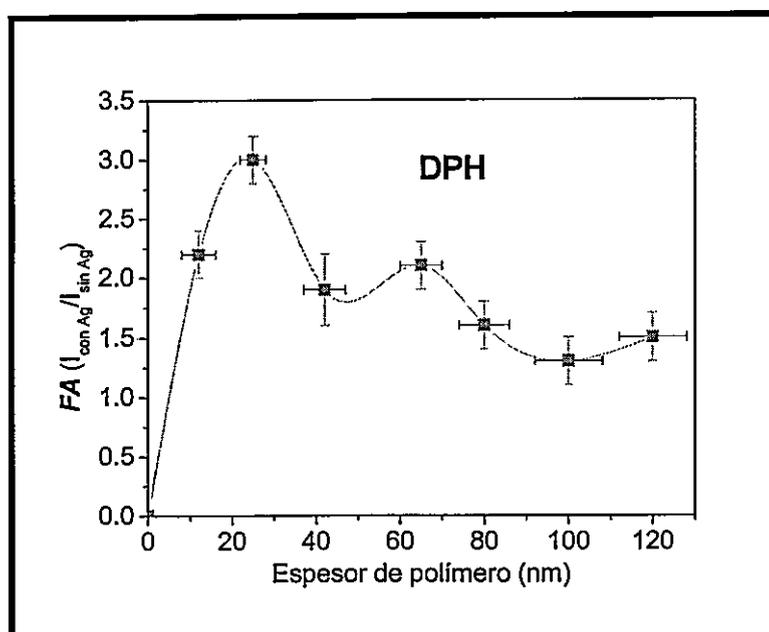


Figura 3.6 Factor de amplificación versus el espesor de polímero sobre la superficie de plata-hidroxilamina

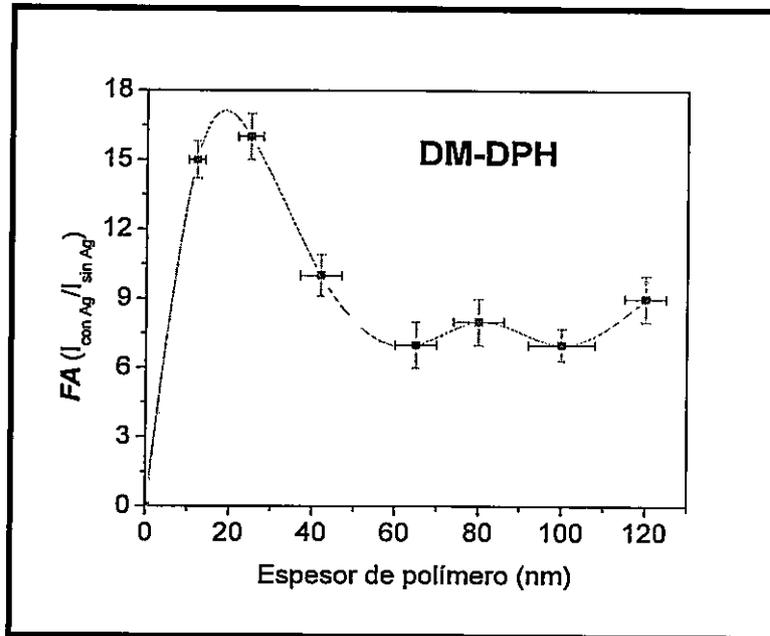


Figura 3.7 Factor de amplificación versus el espesor de polímero sobre la superficie de plata-hidroxilamina

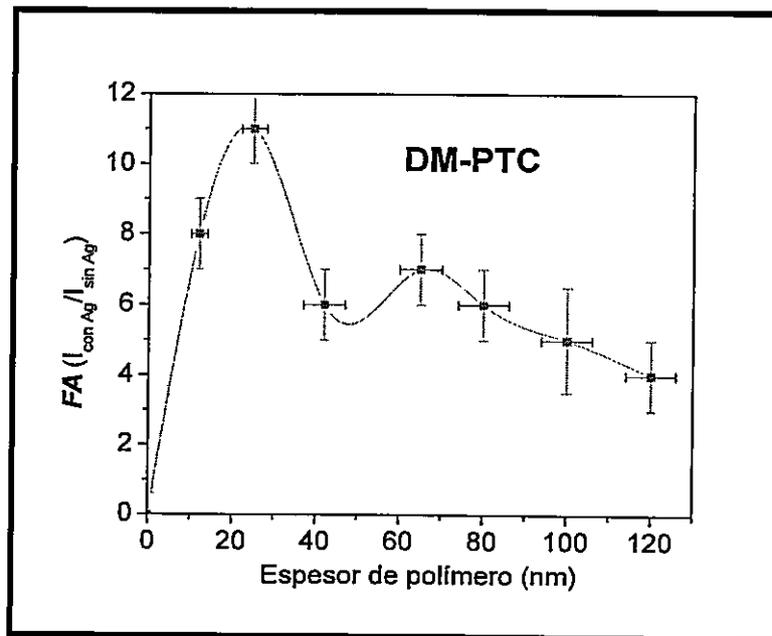


Figura 3.8 Factor de amplificación versus el espesor de polímero sobre la superficie de plata-hidroxilamina

Al observar las figuras anteriores queda claro que el espesor adecuado es de 25 nm aproximadamente. Por otro lado se trabajó con la concentración de molécula que es depositada tanto en la superficie metálica como en el vidrio; para ello se agrega 5ul de molécula disuelta en etanol de diferentes concentraciones. En la figuras en las figuras 3.7 a 3.9 se muestra el resultado de este estudio. Todas las medidas fueron realizadas sobre superficies preparadas con el coloide de hidroxilamina.

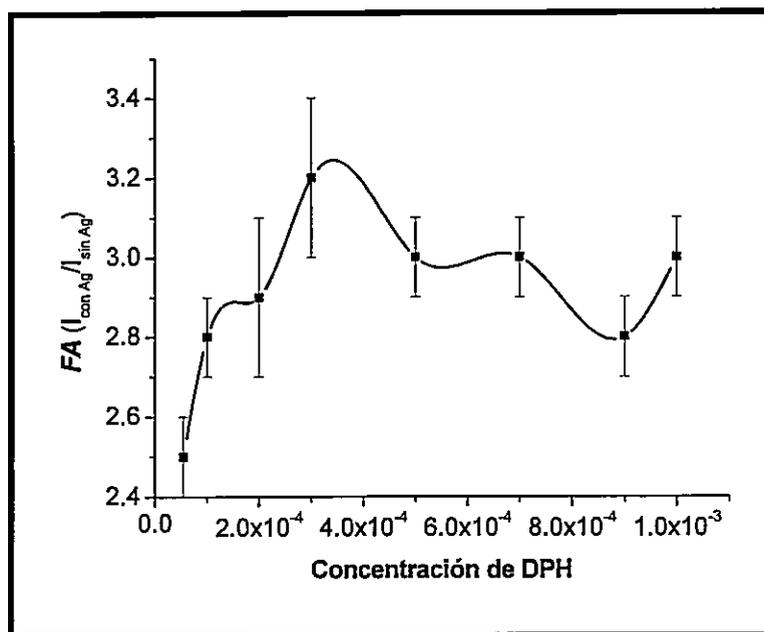


Figura 3.9 Factor de amplificación versus la concentración de DPH

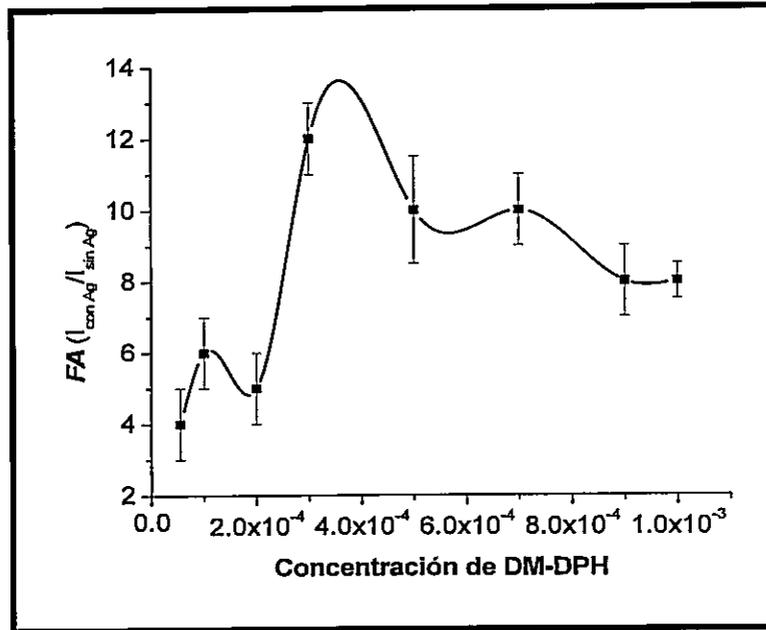


Figura 3.10 Factor de amplificación versus la concentración de DM-DPH

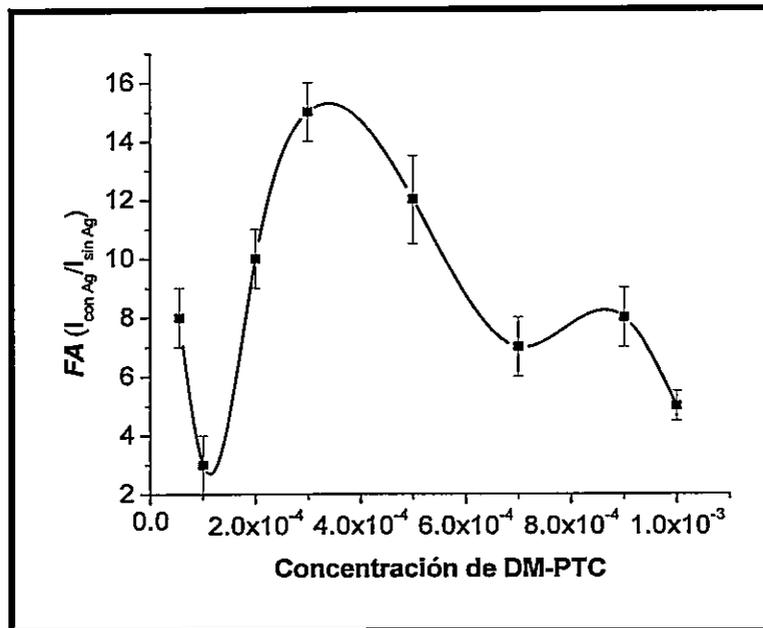


Figura 3.11 Factor de amplificación versus la concentración de DM-PTC

Como se observa en las figuras anteriores la concentración que genera la amplificación máxima para un espesor de polímero de ~25 nm ó 250 Å es de aproximadamente  $4 \times 10^{-4} M$ .

## Apéndice

Ecuaciones teoría de Mie para calcular las propiedades ópticas de nanopartículas metálicas de plata.

```

(* Needs : definition of the (real) refractive index of the medium kMed and
the (complex) refractive index of the particle material nparticle [w]
Provides : Mie coefficients a, b and
scattering extinction and absorption efficiencies Qsca, Qext, Qabs
Uses : light frequency w (in eV)
Particle radius r (in nm)
Multipole order n
*)
j[n_, x_] := (Sqrt[Pi / (2 x)]) BesselJ[n + 1/2, x] (* spherical Bessel function *)
y[n_, x_] := (Sqrt[Pi / (2 x)]) BesselY[n + 1/2, x] (* spherical Bessel function *)
h1[n_, x_] := j[n, x] + 3 y[n, x] (* spherical Hankel function of first kind *)
h2[n_, x_] := j[n, x] - 3 y[n, x] (* spherical Hankel function of second kind *)
psi[n_, x_] := x j[n, x] (* Riccarti-Bessel-Funktion *)
xi[n_, x_] := x h1[n, x] (* Riccarti-Bessel-Funktion *)
psidev[n_, x_] := Derivative[0, 1][psi][n, x]
xidev[n_, x_] := Derivative[0, 1][xi][n, x]
a[n_, x_, m_] := (m psi[n, m x] psidev[n, x] - psi[n, x] psidev[n, m x]) /
(m psi[n, m x] xidev[n, x] - xi[n, x] psidev[n, m x])
b[n_, x_, m_] := (psi[n, m x] psidev[n, x] - m psi[n, x] psidev[n, m x]) /
(m psi[n, m x] xidev[n, x] - m xi[n, x] psidev[n, m x])
X[w_, r_] := w r kMed / 197 (* w in eV, r in nm *)
M[w_] := nparticle[w] / kMed
Qsca[n_, w_, r_] := 2 / (X[w, r]^2) (2 n + 1) (Abs[a[n, X[w, r], M[w]]]^2 + Abs[b[n, X[w, r], M[w]]]^2)
Qext[n_, w_, r_] := 2 / (X[w, r]^2) (2 n + 1) Re[a[n, X[w, r], M[w]] + b[n, X[w, r], M[w]]]
Qabs[n_, w_, r_] := Qext[n, w, r] - Qsca[n, w, r]

```

## PUBLICACIONES

1. **Vibrational and Surface-enhanced Raman spectra of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene**, Igor O. Osorio-Roman, Víctor Vargas C. and Ricardo F. Aroca. Aceptada en Applied Spectroscopy en Marzo del 2007.
2. **New Substrate for Used in Surface-enhanced Fluorescence**, Igor O. Osorio-Roman, Víctor Vargas C., Álvaro Aliaga and Ricardo F. Aroca. En preparación.
3. **Surface-enhanced Fluorescence on Silver Nanoparticles at Low Temperature of 1-[4-(dimetilamino)fenil]-6-fenilhexatrieno (DMA-DPH)**, Igor O. Osorio-Roman, Víctor Vargas C. and Ricardo F. Aroca. En preparación.

## CONGRESOS Y CONFERENCIAS

1. *Fabrication of New Substrate for Surface-enhanced Fluorescence*, I. Osorio, A. Allaga, V. Vargas y R. Aroca., **International Workshop, Frontiers in Materials Research III**, Conference Town, Reñaca, 11-14 October 2006.
2. *Fluorescencia Amplificada por Nanoestructuras de Plata*, Igor Osorio R. y Víctor Vargas C., **XXVI Jornadas Chilenas de Química**, Concepción, CHILE, 6-9 de Enero 2006.
3. *Espectroscopía de Fluorescencia Amplificada por nanoestructuras metálicas*, Igor Osorio R. y Víctor Vargas C., **VIII Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología**, La Plata, ARGENTINA, 8-12 Noviembre 2004.
4. *Fluorescencia de 9-10,Di-X-Antracenos Amplificada por Nanoestructuras de Plata*, Víctor Vargas C., Igor Osorio R. y Patricio Jara A., **4<sup>th</sup> Workshop of Computational Chemistry and Molecular Spectroscopy**, Punta de Tralca, CHILE, 19- 22 de Octubre 2004.
5. *Superficies Amplificadora de Señales en Fluorescencia y en Espectroscopia Raman* Igor Osorio R., P. Leyton B., V. Vargas C., M. Campos-Vallette y E. Clavijo C., S. Sánchez-Cortés y J.V. García-Ramos, **XXV Jornadas Chilenas de Química**, Antofagasta, CHILE, 6-9 de Enero 2004.