

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Física I



TESIS DOCTORAL

Adsorción y detección ultrasensible de sustancias de dopaje deportivo
sobre nanopartículas plasmódicas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Izquierdo Lorenzo

Director

Santiago Sánchez Cortés

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Física I



**ADSORCIÓN Y DETECCIÓN
ULTRASENSIBLE DE SUSTANCIAS DE DOPAJE
DEPORTIVO SOBRE NANOPARTÍCULAS
PLASMÓNICAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Irene Izquierdo Lorenzo

Director
Dr. Santiago Sánchez Cortés

Instituto de Estructura de la Materia
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Madrid, 2012

*If something seems too good to be true,
it usually isn't true.
If there seems to be more than meets the eye,
there usually is more.*

Dr. Mora Pol

A mi Familia. Como todo.

Agradecimientos

Ya está. Por fin llega el momento que más he ansiado durante la escritura de la Tesis: el momento de daros las GRACIAS.

Gracias, Santiago, por guiarme y apoyarme en todo momento. Por todo lo que me has enseñado. Por tu sentido del humor. Por ser, ni más ni menos, el director de Tesis que todos quisieran. Competencia en la materia, trabajo duro y un corazón de carne. Bañado con una caña de vez en cuando. Y nos tienes en el bolsillo.

Gracias a Concha, por estar siempre atenta a las necesidades del grupo. A José Antonio, por hacer que los plasmones sean... comprensibles! Y también por los Johnnie Walker. A mis colegas becarios: Rogelio, no sé qué vas a hacer este fin de semana pero echaré de menos tu sarcasmo; Ramón y su profundidad con voz de tabaco, Eduardo y su valía para todo con una sonrisa tímida, Fernando y phdcomics. Luca y Zuzka, que ya hace tiempo que no nos vemos pero este grupo os tiene en el corazón. Por lo menos por lo que a mí respecta.

Aquí he hecho dos amigas. Elena, mi compañera de beca, ¡vamos bien! Algunas veces pienso que tu modestia te limita un poco, otras veces pienso que si te dieras cuenta de lo que vales serías insoportable, jeje. Gracias por estar siempre en ese lado del despacho cuando me hacía falta. Y Adí, mi guajira, qué te puedo decir que ya no sepas tú bien. Pues probablemente puedo decirte que no desesperes! Porque en todo lo demás, solemos pensar igual, así que tampoco voy a aportar nada.

Y gracias al resto del grupo por hacerlo completo con vuestras personalidades y vuestro trabajo: José Vicente, Mari Vega, Sagrario, Froufe, Nuno. A la gente maravillosa que ha compartido tantas horas de comer y de café: Soto, Javi, Mercedes, Ranjeet (learn Spanish, man! hehe). Y mención honorífica a mi frikiamigo Juan Diego (stick them with the pointy end!) y a Luis Sol, que me inspira.

Y ahora salgo del CSIC y paso a mi gente.

André, obrigada por lutares sempre comigo. Obrigada por partilhar os meus sonhos, e por estar disposto a os vivir conmigo. Por ser sempre a mola que me leva à frente. Por fazer que TUDO seja mais fácil para mim. Por me atorares nos momentos em que sou chata. E por dar novos sentidos a minha vida.

Mamá, papá, gracias por dármelo todo. Por estimular siempre mi curiosidad, por animarme a perseguir mis ambiciones, por cuidar de Vicky cuando estamos liados. Por hacerme sentir que, por mucho que me tire a la piscina, siempre habrá algo de agua.

Mis hermanos. Javi y sus interminables preguntas, el abogado con más alma de científico que podáis imaginar. Eva, o cómo si eres lista puedes alcanzar la felicidad. Y Amaya... espero el día que tengas este volumen en tus manos, porque entonces ya te habré abrazado. No hay Irene sin Amaya. No hay soñadores, no hay talento, no hay juventud ni

futuro del que no seas ejemplo. Y por supuesto, Soraya, mi cuarta hermana. La que siempre está y no desaparece. La roca erosionada por el mar ha acabado siendo una isla preciosa.

I know deep inside you knew I'd keep a word for you, Yan. Thank you for sharing your passion for life and science with me. Thanks for giving me new perspectives and pushing me forward. You'll always be a part of me.

Por último, en los tiempos que corren, en los que un estudio de productividad externo evalúa si merece o no la pena que una persona encienda o no la luz de su despacho, tengo que agradecer a quienes aún invierten su dinero en Investigación. Agradezco al Fondo Social Europeo y al programa JAE del CSIC por la beca-contrato que me ha permitido no sólo los medios para realizar este trabajo, sino también el permitirme el (aún) lujo de ser madre en el comienzo de mi carrera investigadora.

Y Gracias, Señor, por el fuego y el agua.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	5
2.1. Espectroscopía vibracional.....	6
2.2. Propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas	10
2.3. Espectroscopía Raman Intensificada por Superficies (SERS)....	13
2.3.1 Mecanismos de intensificación.....	14
2.3.2 Factor de Intensificación SERS.....	17
2.3.3 Interpretación de los espectros SERS.....	18
2.3.4 Substratos SERS.....	18
2.4. Adsorción molecular sobre superficies.....	22
2.4.1 Modelos de adsorción.....	22
2.4.2 Adsorción directa y funcionalización en SERS.....	24
2.4.3 Propiedades interfaciales de las nanopartículas metálicas.....	26
2.5. Detección molecular basada en espectroscopía SERS.....	27
2.6. Sustancias de dopaje deportivo.....	29
2.6.1 Agonistas de los receptores adrenérgicos β_2	30
2.6.2 Aminoglutetimida.....	31
2.6.3 Probenecid.....	32
2.6.4 Nandrolona.....	33
2.6.5 Detección de sustancias de dopaje deportivo.....	33
3. Objetivos.....	37
4. Parte Experimental.....	39
4.1. Materiales.....	40
4.2. Instrumentación.....	41
4.3. Métodos.....	43
4.3.1. Preparación de nanopartículas metálicas.....	43

4.3.2. Síntesis del ácido 6-ditiocarbámico- β -ciclodextrina y funcionalización de nanopartículas de Ag.....	45
4.3.3. Preparación de muestras y registro de medidas.....	47
4.3.4. Cálculos mecanocuánticos.....	49
5. Resultados y discusión.....	51
5.1. Nanofabricación y ensamblaje de nanopartículas con propiedades plasmónicas.....	52
5.1.1. Caracterización de las diferentes nanoestructuras metálicas fabricadas.....	53
5.1.2. Ensamblaje de nanopartículas plasmónicas mediante sistemas moleculares y formación de <i>hot spots</i> de tamaño controlado.....	60
5.2. Funcionalización de nanopartículas.....	70
5.2.1. Funcionalización con moléculas bifuncionales.....	71
5.2.2. Funcionalización con β -ciclodextrina derivatizada con un grupo ditiocarbamato.....	76
5.3. Detección de sustancias de dopaje deportivo mediante resonancia de plasmón.....	82
5.3.1. Medida del pKa de la aminoglutetimida sobre nanopartículas de plata.....	82
5.3.2. Detección de sustancias de dopaje deportivo por resonancia de plasmón en nanopartículas de oro.....	84
5.4. Detección mediante SERS. Aspectos cualitativos.....	88
5.4.1. Espectros de vibración de sustancias de dopaje deportivo.....	89
5.4.2. SERS de sustancias de dopaje deportivo que interaccionan directamente con el metal.....	97
5.4.3. Detección SERS de analitos mediante la funcionalización de la superficie metálica.....	118
5.5. Análisis cuantitativo de sustancias de dopaje deportivo mediante SERS.....	125
5.5.1 Isotermas de adsorción.....	125
5.5.2 Detección cuantitativa de sustancias de dopaje deportivo mediante SERS.....	134

5.6. Results outline and comparative evaluation.....	142
6. Conclusions.....	145
7. Summary.....	150
8. Bibliografía.....	153
9. Anexos.....	169
9.1. Respuesta óptica del coloide de AgHX agregado con α,ω - bifuncionales alifáticos.....	170
9.2. Tablas de asignaciones de espectros de vibración.....	172
9.3. Espectro SERS de clenbuterol en coloide de Ag.....	177

Índice de figuras

Figura 2.1. Tránsitos energéticos asociados a las diferentes espectroscopías.....	6
Figura 2.2. Plasmones de superficie localizados en una nanopartícula.....	10
Figura 2.3. <i>Izquierda:</i> Suspensiones coloidales de nanoprismas de Ag de diferentes morfologías. Los diferentes colores son debidos a los LSP. <i>Derecha:</i> espectros UV-visible de estos coloides.....	11
Figura 2.4. Variación de la sección eficaz de las distintas técnicas espectroscópicas con la presencia de substratos metálicos.....	14
Figura 2.5. Esquema del mecanismo EM de las Espectroscopías Intensificadas por Superficie.....	15
Figura 2.6. <i>Izquierda:</i> Láser enfocando en un electrodo de Ag de una microcélula electroquímica. <i>Derecha:</i> Suspensiones coloidales de nanopartículas de Au (rojo) y Ag (beige).....	19
Figura 2.7. Modelos de adsorción de moléculas en superficies.....	23
Figura 2.8. Clasificación B.D.D.T. de las isothermas de adsorción.....	24
Figura 2.9. Fórmulas estructurales de clenbuterol, salbutamol y terbutalina, respectivamente.....	31
Figura 2.10. Fórmula estructural de la aminoglutetimida.....	32
Figura 2.11. Estructura molecular de probenecid.....	33
Figura 2.12. Estructura molecular de la nandrolona.....	33

Figura 2.13. Estructura de la β -ciclodextrina.....	35
Figura 4.1. <i>Izquierda:</i> Espectrofotómetro Raman Renishaw RM 200. <i>Derecha:</i> Dispositivo macro enfocando el láser en el interior de una cubeta de cuarzo.....	41
Figura 4.2. Estructura del derivado ditiocarbámico de β -ciclodextrina.....	46
Figura 4.3. Representación de una nanopartícula recubierta de DTCD.....	47
Figura 4.4. Mapa SMS a dos λ de una muestra de nanopartículas esféricas de Ag agregadas con un ensamblador bifuncional.....	48
Figura 4.5. Correlación de un mapa SMS con una micrografía TEM, con mayor resolución espacial.....	49
Figura 5.1. Espectro UV-visible e imágenes SEM de coloides de oro y plata reducidos con citrato (CT).....	54
Figura 5.2. Espectro UV-visible e imagen TEM de un coloide de plata-hidroxiilamina.....	54
Figura 5.3. Espectro UV-visible e imagen TEM del coloide de nanoprismas triangulares de plata (AgNPT).....	55
Figura 5.4. Espectro UV-visible e imagen SEM de nanocuboctaedros de oro.....	56
Figura 5.5. Espectro UV-visible e imagen SEM de nanocubos de oro.....	56
Figura 5.6. <i>a)</i> Espectro Raman de TP puro, <i>b)</i> SERS de TP 10^{-6} M en AgNPT, <i>c)</i> SERS de TP 10^{-6} M en AgCT (intensidad multiplicada 10 veces). $\lambda_{exc} = 785$ nm.....	58
Figura 5.7. Espectros SERS del tiofenol en diversos coloides (10^{-6} M) y Raman del tiofenol puro.....	59

Figura 5.8. Espectro de extinción del coloide de AgHX agregado con concentraciones crecientes de DT6, DT8 y DT10.....	61
Figura 5.9. Espectros diferencia de resonancia del plasmón del coloide de Ag-HX al adicionar DT6, DA6 y DC6, a diferentes concentraciones según se indica en la figura	64
Figura 5.10. . Cambios en la posición de la banda B al disminuir la concentración de ditiolos (a) y diaminas (b). La figura (c) representa la posición de la banda B en función de la longitud de la cadena de DTX y DAX en las mismas condiciones de recubrimiento.....	66
Figura 5.11. Espectro de extinción e imágenes TEM de dos dímeros ensamblados con DT6 analizados con espectroscopía de modulación espacial.....	67
Figura 5.12. Imágenes TEM del coloide de plata con concentraciones crecientes de DT8: <i>a)</i> antes de la agregación; <i>b)</i> $5 \times 10^{-7} \text{M}$; <i>c)</i> 10^{-6}M , <i>d)</i> 10^{-5}M ; <i>e)</i> Detalle de un agregado recubierto de DT8.....	68
Figura 5.13. Espectros SERS de DT6, DT8 y DT10: <i>a)</i> 10^{-6}M ; <i>b)</i> $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$; <i>c)</i> Espectros Raman de los líquidos puros.....	72
Figura 5.14. Representación de las relaciones de intensidades I_{2850}/I_{2920} (<i>izquierda</i>) y I_{630}/I_{700} (<i>derecha</i>) al variar la longitud de la cadena y la concentración de ditiol.....	73
Figura 5.15. Representación esquemática de los diferente modelos de adsorción de ditiolos deducidas a partir de los espectros SERS, con los cambios estructurales en las moléculas al variar el recubrimiento de la superficie y la consiguiente variación de la distancia entre NPs.....	74
Figura 5.16. Espectros Raman (<i>arriba</i>) y SERS (<i>abajo</i>) de los ácidos dicarboxílicos DC6 (<i>a</i>), DC8 (<i>b</i>), DC10 (<i>c</i>) y DC12 (<i>d</i>).....	75

Figura 5.17. Espectros Raman de 6-monoamino- β -ciclodextrina (NCD) y ácido 6-ditiocarbámico- β -ciclodextrina (DTCD) en estado sólido, registrados con excitación a <i>a)</i> 532 nm y <i>b)</i> 785 nm. Las bandas marcadas con asterisco corresponden a la DMF.....	76
Figura 5.18. Bandas características del producto de reacción: Espectro diferencia DTCD menos NCD.....	77
Figura 5.19. Espectro infrarrojo de DTCD y NCD.....	78
Figura 5.20. Espectros SERS de DTCD sobre varios coloides, con $\lambda_{exc} = a)$ 785 nm y <i>b)</i> 532 nm.....	79
Figura 5.21. Esquema de la adsorción de DTCD sobre nanopartículas de Ag.....	80
Figura 5.22. Intensidad de la banda a 480 cm^{-1} de la DTCD frente a la concentración de este mismo compuesto.....	80
Figura 5.23. A: Espectro de extinción del coloide de AgNPT a diferentes pH en presencia de AGI (10^{-5} M). B: Variación de la extinción a 702 nm frente al pH, ajuste sigmoidal y valor de pKa calculado. C: Micrografía de un agregado de AgNPT en el que se observa apilación sobre las caras triangulares.....	83
Figura 5.24. Espectro de extinción UV-visible del coloide de oro en presencia de 0,03 M de KNO_3 y 10^{-5} M de aminoglutetimida, clenbuterol, terbutalina y salbutamol.....	85
Figura 5.25. <i>Izquierda:</i> Espectros de extinción del coloide de oro con 0,03 M de KNO_3 : <i>a)</i> en ausencia de analito; y en presencia de SB a las siguientes concentraciones: <i>b)</i> 10^{-6} M , <i>c)</i> 10^{-5} M , <i>d)</i> 10^{-4} M . <i>Derecha:</i> Intensidad de la banda de los agregados al aumentar las concentraciones de SB y CB, ajustadas a curvas sigmoidales.....	86
Figura 5.26. Fórmula estructural y espectros de vibración del clorhidrato de clenbuterol: <i>a)</i> IR del sólido en KBr, <i>b)</i> Raman del sólido, <i>c)</i> Raman en disolución acuosa (0,1 M). $\lambda_{exc} = 1064\text{ nm}$	90

Figura 5.27. Fórmula estructural y espectros de vibración del salbutamol en estado sólido: a) IR en KBr, b) Raman con $\lambda_{exc} = 1064$ nm.....	92
Figura 5.28. Fórmula estructural y espectros de vibración de la aminoglutetimida, a) IR del sólido en KBr, b) Raman del sólido, c) Raman en disolución etanólica (0,1 M) $\lambda_{exc} = 1064$ nm	93
Figura 5.29. Fórmula estructural y espectros de vibración del probenecid en estado sólido: a) IR en KBr, b) Raman con $\lambda_{exc} = 1064$ nm.....	95
Figura 5.30. Fórmula estructural y espectros de vibración de la nandrolona en estado sólido: a) IR en KBr, b) Raman con $\lambda_{exc} = 1064$ nm.....	97
Figura 5.31. (a-g): Espectros SERS del clembuterol (10^{-5} M) a los siguientes pH a) 3; b) 4; c) 5; d) 7; e) 8; f) 9.5; g) 11; h) Espectro Raman de clembuterol en estado sólido. Excitación a 785 nm.....	100
Figura 5.32. Esquema del mecanismo de interacción y la orientación deducidos para CB sobre NPs de Au	101
Figura 5.33. (a-e): Espectros SERS del SB (10^{-5} M) registrados a los siguientes pH: a) 11; b) 8; c) 7; d) 5; e) 4; f) 3; g) Espectro Raman del salbutamol en estado sólido. <i>Arriba:</i> Esquema de la adsorción de SB deducida a partir de los espectros. Excitación a 785 nm.....	102
Figura 5.34. Espectros SERS de terbutalina (10^{-5} M) a los siguientes pH: a) 3.3, b) 4.0, c) 5.0, d) 7.5, e) 11.0. f) Espectro Raman del hemisulfato de terbutalina en estado sólido. <i>Arriba:</i> Esquema del mecanismo de interacción y orientación deducida de TB sobre Au deducida de los espectros en función del pH. Excitación a 785 nm.....	103
Figura 5.35. Estructura de la AGI en la que se distinguen sus dos partes estructurales principales: la anilina (AN) y glutarimida (GI).....	105

Figura 5.36. Espectros SERS de la AGI a pH 6.0 en los siguientes sustratos y concentraciones: a) AgCT ([AGI]= 10^{-6} M) (los asteriscos indican bandas del citrato); b) AgNPT ([AGI]= 10^{-6} M); c) AgHX ([AGI]= 10^{-4} M); y d) AgBH4 ([AGI]= 10^{-4} M). El espectro (e) es el Raman de la AGI en etanol (0.5 M). Excitación a 632.8 nm.....	107
Figura 5.37. Espectros SERS de la AGI en AuCT a los siguientes valores de pH: a) 2.5, b) 4, c) 5, d) 7, e) 11; f) Espectro Raman de la AGI sólida.....	109
Figura 5.38. Esquema que muestra el mecanismo de adsorción propuesto en AuNP..	110
Figura 5.39. Espectros SERS de la AGI (10^{-4} M) en AgCT a pH 2.0, 4.4, 6.0, 9.0 y 11.0, y en AgNPT pH 4.4, 6.0, 9.0, 11.0.....	111
Figura 5.40. Variación de la intensidad de la banda a 1606 cm^{-1} para ambos coloides, normalizadas a su valor máximo.....	112
Figura 5.41. Espectros SERS de la AGI a diferentes concentraciones y pH 9.0.....	114
Figura 5.42. Representación de I_{1150}/I_{1190} frente a [AGI], y de la reorientación de interacción bidentada a monodentada.....	114
Figura 5.43. Espectros SERS de probenecid (10^{-3} M) en coloide de AgCT y AgHX, a pH 5, normalizados a la banda del agua. Excitación a 532 nm.....	116
Figura 5.44. Esquema del mecanismo de adsorción de PB en Ag. Espectros SERS de PB (5×10^{-4} M) en coloide de AgCT, a los siguientes valores de pH: a) 4.5, b) 5.5, c) 6.1, d) 8.5, e) Espectro del coloide AgCT, f) espectro Raman de PB sólido. Excitación a 532 nm.....	117
Figura 5.45. Complejo de inclusión entre NR y DTCD sobre la superficie de Ag que permite el acercamiento de NR al metal y su detección SERS	119
Figura 5.46. Espectros SERS de: a) NR (10^{-3} M) sobre NPs de AgCT funcionalizadas con DTCD (5×10^{-4} M); b) DTCD; c) Espectro diferencia [(a)-(b)]; d) Raman de NR sólida. Excitación a 532 nm.....	121

Figura 5.47. Espectros SERS a $\lambda_{exc} = 785$ nm de DT6, DT8 y DT10 a) en ausencia y b) en presencia de 360 ppb de Aldrín; c) Estructura del Aldrín.....	123
Figura 5.48. Región entre 1750 y 1350 cm^{-1} en los espectros SERS a $\lambda_{exc} = 785$ nm de: DT6, DT8 y DT10 (5×10^{-6} M) en presencia de Aldrín.....	124
Figura 5.49. Intensidad SERS de las bandas marcadoras frente a concentración de AA β ($\lambda_{exc} = 785$ nm) y ajustes a curvas de Langmuir.....	128
Figura 5.50. Intensidad SERS de la banda a 647 cm^{-1} frente a concentración de AGI, y ajuste a una curva de Langmuir. $\lambda_{exc} = 785$ nm.....	130
Figura 5.51. Variación de la intensidad relativa de la banda SERS a 1606 cm^{-1} en AgCT (azul) y AgNPT (rojo) al variar la concentración de AGI. $\lambda_{exc} = 632.8$ nm.....	131
Figura 5.52. Intensidad de la banda a 1595 cm^{-1} del PB frente a la concentración de droga en el coloide. Excitación a 532 nm.....	133
Figura 5.53. Ajuste lineal de la I_{SERS} frente a la concentración de AA β en condiciones de baja concentración ($10^{-8} - 5 \times 10^{-6}$ M). $\lambda_{exc} = 785$ nm.....	136
Figura 5.54. Ajuste lineal de la I_{SERS} de la banda marcadora de AGI en AuCT (647 cm^{-1}) frente a la concentración en la región de linealidad ($10^{-8} - 10^{-5}$ M). Excitación a 785 nm.....	137
Figura 5.55. Variación de la banda SERS de la AGI a 1606 cm^{-1} en AgCT y AgNPT con la concentración de AGI en las regiones de linealidad de cada uno de estos sustratos y ajustes lineales derivados. Excitación a 632.8 nm.....	138
Figura 5.56. Ajuste lineal de I_{SERS} para la banda a 1595 cm^{-1} frente a la concentración de PB en la región de linealidad: $5 \times 10^{-7} - 10^{-5}$ M. $\lambda_{exc} = 532$ nm.....	139
Figura 5.57. Variación de la intensidad de la banda de NR a 1616 cm^{-1} en función de la concentración del anabolizante y regresión lineal de los datos. Excitación a 532 nm.....	140

Figure 7.1. Representation of the adsorption process of terbutaline on Au NPs, as deduced from the SERS spectra.....	150
Figure 7.2. Nandrolone (a) and aldrin (b) occupying host spaces in functionalised surfaces.....	151
Figura 9.1. Espectros UV-visible del coloide de AgHX agregado con dicarboxilatos.....	170
Figura 9.2. Espectros de extinción UV-visible del coloide de AgHX agregado con DT6, DT8 y DT10 a 5×10^{-6} M (agregados lineales) y 5×10^{-4} M (agregados globulares).....	171
Figura 9.3. Espectro SERS de CB (10^{-4} y 10^{-5} M) en coloide de AgHX, $\lambda_{exc} = 514$ nm. Espectro Raman de CB sólido, $\lambda_{exc} = 1064$ nm.....	177

Índice de Tablas

Tabla 5.1. Factores de intensificación para tiofenol con coloides de Au de diferente morfología.....	59
Tabla 5.2: Concentraciones mínimas de diversos ensambladores necesarias para iniciar la agregación de NPs de Ag.....	62
Tabla 5.3. Concentraciones mínimas para la formación de agregados lineales y globulares en AgHX al adicionar α,ω -ditiolos.....	63
Tabla 5.4. Análisis comparativo de la banda de extinción correspondiente a los agregados de nanopartículas inducidos por la adsorción de los SDD.....	85
Tabla 5.5. Características de las NP metálicas fabricadas y factores de intensificación deducidos a partir de los espectros SERS registrados a pH=6.0.....	108

Tabla 5.6. Resultados del ajuste a curvas de Langmuir. Constantes de adsorción en las nanopartículas de oro para cada dopante AA β	128
Tabla 5.7. Parámetros de adsorción calculados a partir de los ajustes de Langmuir de la AGI sobre AuCT, AgCT y AgNPT.....	132
Tabla 5.8. Resultados del ajuste lineal a bajas concentraciones y LD obtenidos por SERS de AA β	136
Table 5.9. Experimental conditions that lead to highest SERS intensities of all analytes studied in this Thesis.....	142
Tabla 9.1. Asignación de bandas de las vibraciones más importantes presentes en los espectros IR y Raman del clenbuterol.....	172
Tabla 9.2. Asignación de bandas de las vibraciones más importantes presentes en los espectros IR y Raman del salbutamol.....	173
Tabla 9.3. Asignación de las bandas más importantes de los espectros Raman e IR de la aminoglutetimida en estado sólido.....	174
Tabla 9.4. Asignación de las bandas SERS más importantes de la aminoglutetimida en AuCT (pH=4.0), AgCT a bajas y altas concentraciones y AgNPT (pH=9.0).....	175
Tabla 9.5. Asignación de las bandas más importantes de los espectros IR y Raman del probenecid en estado sólido.....	176

Listado de símbolos y acrónimos

AgCT: coloide de plata - citrato
AgHX: coloide de plata - hidroxilamina
AGI: aminoglutetimida
AgNPT: coloide de plata – nanoprismas triangulares
ALD: aldrín
Alic: residuo alicíclico
Alif: residuo alifático
Ar: residuo aromático
as: asimétrico
AuCT: coloide de oro - citrato
AuNC: coloide de oro - nanocubos
AuNCO: coloide de oro - nanocuboctaedros
CB: clenbuterol
 β -CD: β -ciclodextrina
CT: citrato
 δ : deformación
DA6: 1,6-hexanodiamina
DA8: 1,8-octanodiamina
DA10: 1,10-decanodiamina
DA12: 1,12-dodecanodiamina
DC6: Ácido 1,6-dicarboxihexandioico
DC8: Ácido 1,8-dicarboxioctandioico
DC10: Ácido 1,10-dicarboxidecandioico
DC12: Ácido 1,12-dicarboxidodecanodioico
DT6: 1,6-hexanoditiol
DT8: 1,8-octanoditiol
DT10: 1,10-decanoditiol
DTCD: 6-ditiocarbamato de β -ciclodextrina
DMF: dimetilformamida
EC: electroforesis capilar
EF: factor de intensificación

EM: electromagnético
FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
 γ : vibración fuera del plano
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
HS: *hot spot*
HX: hidroxilamina
IR: infrarrojo
ip: en el plano
LOD: límite de detección
LSP: plasmón de superficie localizado
LSPR: resonancia de plasmón de superficie localizado
 ν : tensión de enlace
NCD: 6-monoamino- β -ciclodextrina
NP: nanopartícula
NR: nandrolona
NV: nanovarilla
PB: probenecid
Ph: anillo bencénico
Ppb: milmillonésima parte (ng/mL)
 ρ : modo rocking
s: simétrico
SB: salbutamol
SDD: sustancias de dopaje deportivo
SEM: microscopía electrónica de barrido
SMS: espectroscopía UV-visible con modulación espacial
ss: deformación en tijera (*scissoring*)
t: modo twisting
TB: terbutalina
TEM: microscopía electrónica de transmisión
UV: ultravioleta
 ω : Modo wagging

1. INTRODUCCIÓN

Las competiciones deportivas ponen a prueba la capacidad física de los deportistas participantes. El código ético del deporte dicta que, para que la competición sea considerada justa, los participantes no podrán alterar químicamente su capacidad física, lo que podría conseguirse mediante el consumo de sustancias de dopaje deportivo (SDD). Así pues, la detección efectiva de SDD es un problema analítico que resuelve una cuestión ética, además de poseer el elevado interés mediático y económico ligado a las competiciones deportivas profesionales. En los últimos años, de hecho, el dopaje deportivo ha sido con frecuencia tema de titulares en la prensa de nuestro país. Las técnicas que se emplean para la detección de SDD deben combinar información cualitativa para su identificación, elevada sensibilidad y rapidez de respuesta.

La espectroscopía Raman es una técnica que proporciona información estructural de la molécula y permite la identificación de varios componentes en una mezcla. Por lo tanto, entra dentro de los requisitos necesarios para la detección de SDD. Sin embargo, sus aplicaciones analíticas están claramente limitadas por la baja sección eficaz de la difusión Raman^[1] y por la fluorescencia que en algunos casos también es emitida por el material analizado.

La espectroscopía SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) ha constituido un gran avance en los últimos tiempos en el ámbito de la espectroscopía Raman^[2, 3]. Este avance ha corrido de la mano del subsiguiente desarrollo de lo que ha venido considerándose como una nueva técnica: la Plasmónica. La técnica SERS emplea superficies metálicas nanoestructuradas, donde existen plasmones de superficie, como soportes para aumentar la sección eficaz Raman.

En general, se tiene que cuando la radiación electromagnética incide sobre materiales metálicos dotados de una morfología en la que es posible una localización de plasmones de superficie (superficies nanoestructuradas y nanopartículas), se produce una notable intensificación del campo electromagnético en la superficie si existe absorción resonante por parte del metal. Este efecto implica un aumento de la absorción y difusión de fotones por parte de aquellas moléculas situadas sobre las nanopartículas (NPs) produciendo un espectacular aumento en la sección eficaz en técnicas espectroscópicas ópticas como la difusión Raman, la absorción IR y la emisión de fluorescencia ^[4-7]. Sin embargo, el efecto más importante se observa en la espectroscopía Raman, que experimenta una intensificación cifrada entre 6 y 10 órdenes de magnitud.

Sobre la superficie metálica ocurren otros efectos a nivel molecular que también es importante considerar para analizar los resultados que se observan a partir de las aplicaciones de superficies de naturaleza plasmónica. Entre ellos cabe destacar la transferencia de carga entre el analito y la superficie, que también juega un papel esencial en la intensificación y la modificación de los espectros SERS. También es necesario considerar la transferencia de energía que ocurre entre el adsorbato y el metal, y que genera una atenuación de la fluorescencia que ha permitido en muchos casos observar por primera vez el espectro Raman para algunas moléculas.

La técnica SERS ha avanzado considerablemente en los últimos años, sobre todo en lo que concierne a las aplicaciones analíticas de sustancias de interés medioambiental, biológico y farmacológico. Tanto es así que dicha técnica se ha convertido en una herramienta ultrasensible, capaz de llevar a cabo la detección e identificación de moléculas aisladas^[8-10].

En los últimos tiempos, los principales avances de esta técnica se han producido sobre todo en lo referente a la nanofabricación de materiales con propiedades plasmónicas, con el desarrollo de sistemas más controlables. En este sentido, las nanopartículas metálicas suspendidas en un medio o coloides metálicos se han convertido en el sustrato SERS más empleado debido a su alta eficacia. Ello es así porque la agregación parcial de las NPs da lugar a intensas señales SERS, sobre todo en el espacio remanente entre NPs próximas (conocidas como “*hot spots*”), en donde tiene lugar una máxima amplificación del campo, como se ha comprobado en estudios teóricos y experimentales^[11-13]. También se ha avanzado mucho en el control de la morfología de las NPs generadas mediante síntesis en disolución. Según los estudios

teóricos, las NPs que presentan vértices o recodos generan campos más intensos que las isotrópicas. Sin embargo, el avance en nanofabricación no se ha visto acompañado del desarrollo de la potencialidad de estas superficies en SERS.

Un proceso fundamental para que ocurra intensificación Raman mediada por el efecto SERS es la adsorción física o química de la molécula sobre la superficie metálica. En algunos casos este fenómeno se da espontáneamente debido a la estructura de la molécula. Sin embargo, un gran número de moléculas de interés no presentan afinidad por los metales plasmónicos. En esos casos, es necesario recurrir a la funcionalización de las superficies activas con moléculas receptoras adecuadas^[14-16] para detectarlas por SERS. Este proceso crucial para el éxito de los experimentos SERS no ha sido estudiado hasta la fecha con la extensión que se merece.

Con esta Tesis se propone el uso de la espectroscopía SERS en la detección de sustancias de dopaje deportivo, ya que además de cumplir los requisitos demandados para este análisis, presenta ciertas ventajas frente a técnicas más extendidas en este campo (HPLC-MS, GC-MS), como son el menor coste, y la posibilidad de análisis directo sin tratamiento previo que en definitiva redonda en un ahorro de tiempo.

Para llevar a cabo esta aplicación ha sido necesario llevar a cabo un profundo análisis de los espectros vibracionales de estas moléculas, de su adsorción sobre diferentes superficies y, finalmente, la detección a bajas concentraciones. Las sustancias seleccionadas en esta Tesis para desarrollar esta investigación fueron clenbuterol, salbutamol, terbutalina, aminoglutetimida, nandrolona y probenecid. Para cada una de estas moléculas se ha desarrollado el estudio anterior, lo que ha conducido a la obtención de las condiciones óptimas de máxima sensibilidad necesarias para la caracterización y detección de cada sustancia. En su caso también se han desarrollado métodos de funcionalización adecuados para moléculas que no son capaces de adsorberse de manera espontánea.

2. ANTECEDENTES

2.1. Espectroscopía vibracional.....	6
2.2. Propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas.....	10
2.3. Espectroscopía Raman Intensificada por Superficies (SERS).....	13
2.3.1. <i>Mecanismos de intensificación</i>	14
2.3.2. <i>Factor de intensificación SERS</i>	17
2.3.3. <i>Interpretación de los espectros SERS</i>	18
2.3.4. <i>Substratos SERS</i>	18
2.4. Adsorción molecular sobre superficies.....	22
2.4.1. <i>Modelos de adsorción</i>	22
2.4.2. <i>Adsorción directa y funcionalización en SERS</i>	24
2.4.3. <i>Propiedades interfaciales de las nanopartículas metálicas</i>	26
2.5. Detección molecular basada en espectroscopía SERS.....	27
2.6. Sustancias de dopaje deportivo.....	29
2.6.1. <i>Agonistas de los receptores adrenérgicos β_2</i>	29
2.6.2. <i>Aminoglutetimida</i>	30
2.6.3. <i>Probenecid</i>	31
2.6.4. <i>Nandrolona</i>	32
2.6.5. <i>Detección de sustancias de dopaje deportivo</i>	33

2.1 Espectroscopía vibracional

La *espectroscopía* es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Un haz de luz que interactúe con la materia puede ser absorbido, emitido, reflejado o dispersado por la misma, dependiendo de las características de ambas. Todos estos procesos permiten el estudio de la materia mediante una técnica espectroscópica apropiada ^[17]. Esto se debe a que las propiedades ópticas de la materia vienen dadas por su estructura química: posición relativa de los átomos, tipo de enlace y estructura electrónica. Por tanto, el estudio de las modificaciones de la luz tras su interacción con una molécula proporciona información sobre la estructura de la molécula en cuestión. Las propiedades que caracterizan a la radiación electromagnética y que pueden experimentar una variación en la interacción de la radiación con la molécula son longitud de onda e intensidad.

El origen de las espectroscopías electrónica, vibracional y rotacional está relacionado con la cuantización de la energía de las moléculas, que hace que las transiciones energéticas asociadas a una transición de éstas desde un estado energético inferior a uno superior (o viceversa) se den a longitudes de onda definidas por su estructura. Si se hace llegar a la molécula un fotón de energía igual a la diferencia de energía entre su estado fundamental y uno excitado, dicha molécula absorberá la energía del fotón induciéndose una transición energética.

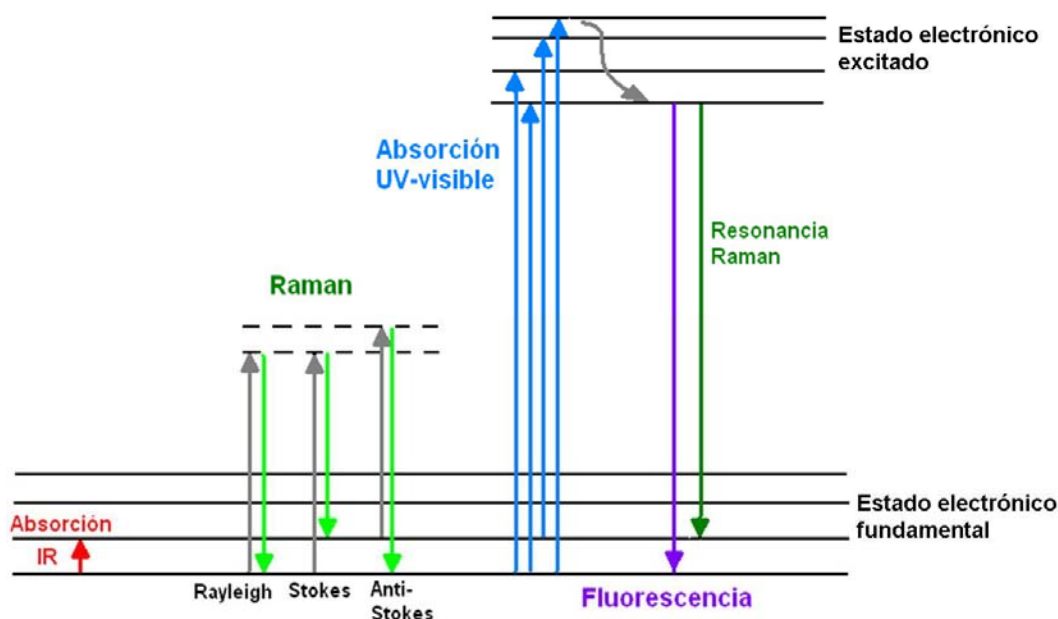


Figura 2.1. Tránsitos energéticos asociados a las diferentes espectroscopías.

La espectroscopia infrarroja (IR) se basa en la absorción de luz infrarroja por una molécula. Los espectros IR de las moléculas se presentan, comúnmente, como la representación gráfica de la intensidad de radiación absorbida frente a su número de ondas (el inverso de la longitud de onda) expresado en cm^{-1} . Debido a que número de ondas y frecuencia (inversa del periodo, con unidades de s^{-1}) de una onda son directamente proporcionales, a menudo se utiliza el término “frecuencia” para referirse, en realidad, a número de ondas.

El fenómeno de espectroscopía IR puede explicarse desde un punto de vista clásico o mecanocuántico^[18]. La visión clásica del electromagnetismo considera que el átomo está formado por un núcleo positivo rodeado de una nube electrónica negativa, de tal modo que cada enlace entre dos átomos constituye un dipolo eléctrico y la molécula presenta un momento dipolar en conjunto, ya sea de carácter permanente o inducido. Los cambios en el momento dipolar de la molécula (μ) inducidos por la vibración de los núcleos, es decir, por el cambio en la posición relativa de los núcleos son responsables de las bandas de absorción registradas en los espectros IR.

Asimismo, desde un punto de vista mecanocuántico, estos cambios se interpretan como transiciones entre los niveles de energía vibracional de la molécula, de tal forma que cada banda de absorción infrarroja tiene una energía igual a la de una transición entre el estado fundamental y un estado excitado correspondiente a un modo normal de vibración de la misma. Las transiciones vibracionales activas son aquellas que implican un cambio en el momento dipolar de la molécula.

La espectroscopía Raman es un fenómeno que se basa en la difusión inelástica de luz por un material o molécula^[19] y también puede ser explicada tanto desde un punto de vista clásico como mecanocuántico.

La difusión de luz, también llamada en ocasiones dispersión, alude al término inglés *scattering*. Sin embargo la dispersión está más bien relacionada con el cambio de trayectoria que sufre un haz de luz al pasar de un medio a otro de diferente índice de refracción.

Desde un punto de vista clásico, la difusión de luz se produce como consecuencia de la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Si la radiación incide sobre la nube electrónica de una molécula, se genera un momento dipolar inducido debido a la polarizabilidad de la misma, que viene dado por la siguiente expresión;

$$\vec{\mu} = \alpha \cdot \vec{E} \quad (1)$$

Donde μ es el momento dipolar inducido, α la polarizabilidad molecular y E es la intensidad del campo eléctrico externo. El carácter variable del campo ($E=E_0\cos\omega_0t$) convierte a este momento dipolar en un emisor de radiación electromagnética. La radiación emitida puede ser elástica, si el valor de la radiación difundida es el mismo que el de la radiación incidente (ω_0), entonces se conoce como radiación Rayleigh. La variación de μ puede también estar modulada por las vibraciones moleculares, dando lugar a radiación difusa inelástica, conocida como radiación Raman. La radiación Raman tiene dos componentes: la radiación Raman Stokes, de menor energía ($\omega_0-\omega_R$), y la radiación Raman anti-Stokes, de mayor energía ($\omega_0+\omega_R$).

Desde un punto de vista cuántico el origen de estas radiaciones puede derivarse de una serie de transiciones electrónicas entre el nivel electrónico fundamental y un estado virtual en el que la molécula permanece un corto intervalo de tiempo, tal como se representa en la Figura 2.1, dando lugar a los dos tipos de radiación Raman (Stokes y anti-Stokes, según se produzca un proceso elástico o inelástico).

La intensidad de la radiación Rayleigh es mucho mayor que la difusión inelástica Raman. Además la intensidad de la componente Raman Stokes es mayor que la componente anti-Stokes, sin embargo la intensidad relativa de estas radiaciones depende de la temperatura, según la distribución de Boltzmann. La sección eficaz, que es un parámetro que mide la probabilidad de que un determinado fenómeno suceda (absorción IR, emisión de fluorescencia, difusión Raman, etc.), se emplea normalmente en espectroscopía para determinar la eficacia de una técnica.

Por lo dicho anteriormente, el efecto Raman presenta una sección eficaz muy baja. En un caso típico sólo un fotón de cada 10^6 que llegan a una molécula es difundido inelásticamente. La energía cedida o emitida al fotón también es coincidente con la energía de un modo normal de vibración de la molécula, con la diferencia respecto a la espectroscopía infrarroja que serán activos en Raman los modos vibracionales que produzcan en la molécula un cambio en la polarizabilidad de la misma, en lugar de un cambio en el momento dipolar.

La sección eficaz Raman de una molécula aumenta considerablemente en la difusión Raman resonante (RRS). Este fenómeno se da cuando la energía utilizada para la excitación de la nube electrónica coincide con una transición electrónica permitida para la molécula, el número de fotones absorbidos por la molécula es mayor, y también el

número de fotones difundidos inelásticamente. Sin embargo, este efecto es frecuentemente eclipsado por fenómenos de fluorescencia, de mayor eficiencia, que tienden a ocultar la señal Raman.

2.2 Propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas

Cuando la superficie de un metal se encuentra en contacto con un dieléctrico, tienen lugar oscilaciones colectivas de los electrones libres en la interfase que se denominan *plasmones de superficie* (SP, por sus siglas en inglés) [20]. Si una radiación electromagnética incide sobre la interfase metal-dieléctrico se produce la excitación de los SPs generándose ondas electromagnéticas que se propagan a lo largo de la interfase, y se conocen como *polaritones de plasmón de superficie* (SPP). Estas ondas electromagnéticas se propagan en la interfase, que actúa como auténtica guía de ondas, siendo evanescentes, es decir, no se propagan ni en el interior del metal ni en el dieléctrico. Cuando la superficie de una nanoestructura metálica presenta alteraciones morfológicas, lo que suele ocurrir en un espacio tan reducido, los SPPs se encuentran confinados, pasando a ser *plasmones de superficie localizados* (LSP).

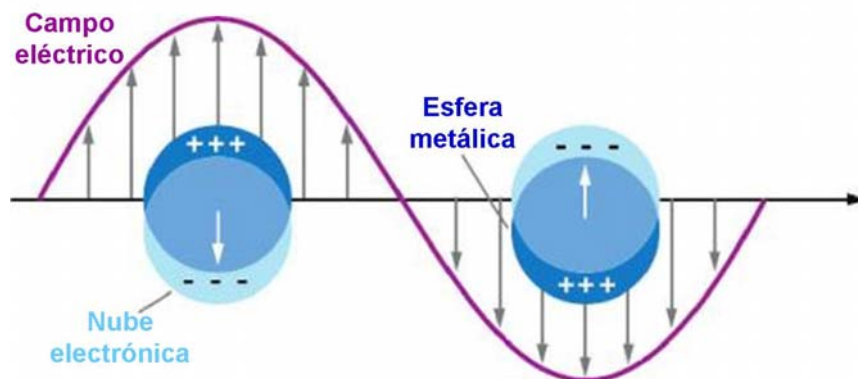


Figura 2.2. Plasmones de superficie localizados en una nanopartícula.

Así por ejemplo, en una nanopartícula metálica de dimensiones muy reducidas en relación a la longitud de onda de la radiación incidente ($D \ll \lambda$, donde D es el diámetro de la partícula), se tiene que los SPPs están localizados dando lugar a LSP que resuenan a una frecuencia dada, que es función de su constante dieléctrica, la morfología y el tamaño de la nanoestructura. Al incidir un fotón sobre la superficie en condiciones de resonancia con la frecuencia de los LSP, éstos son excitados, dando lugar al fenómeno conocido como *Resonancia de Plasmón Superficial Localizado* (**LSPR**), lo que conduce a una polarización de la nanopartícula como se muestra en la Figura 2.2.

Las NPs de metales nobles, como oro, plata y cobre, poseen plasmones de superficie localizados con resonancias en la región del visible ^[5, 21]. Esto hace que dichas partículas tengan color y, como veremos más adelante, que sean el sustrato ideal para un experimento SERS. Artículos de revisión como el de Kelly et al.^[22], Mulvaney^[23] o El-Sayed^[24] recogen las posibles explicaciones de las propiedades ópticas de partículas metálicas de diferentes tamaños y formas. En estos trabajos se analiza el efecto del disolvente y de la adsorción de otras moléculas o iones sobre dichas propiedades. Por otra parte, las resonancias de plasmón pueden ser medidas mediante los espectros de extinción. Es decir, midiendo la cantidad de radiación que no es transmitida por el medio debido a dos efectos principales: absorción y difusión de la luz por las nanopartículas, ambos efectos considerablemente aumentados en condiciones de LSPR.

En líneas generales, el espectro de extinción de NPs esféricas presenta un máximo intenso debido a la oscilación dipolar de los LSP que aparece a una longitud de onda que depende del tamaño de las mismas. Cuanto menor sea el tamaño de partícula, la excitación de los LSP se producirá a longitudes de onda más bajas. Cuando las partículas presentan alguna anisotropía, el modo dipolar se desplaza hacia el rojo, y aparecen además modos cuadrupolares a longitudes de onda inferiores (Figura 2.3).

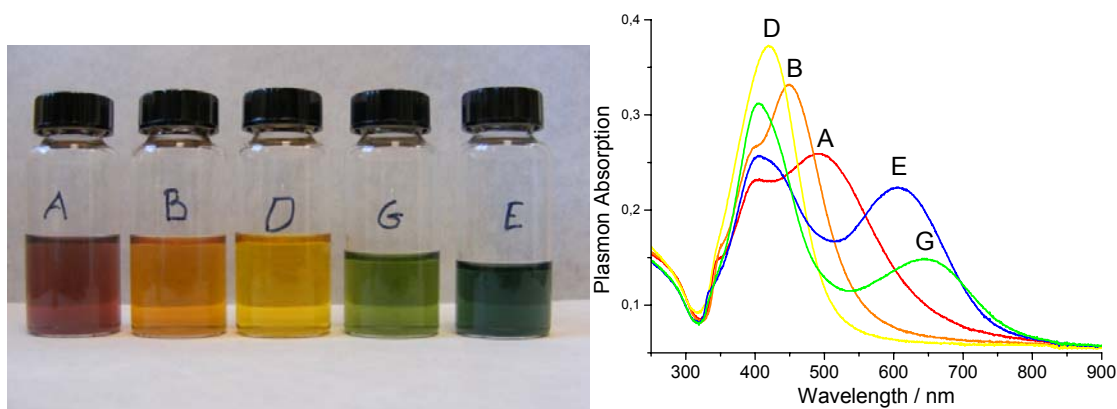


Figura 2.3. Izquierda: Suspensiones coloidales de nanoprismas de Ag de diferentes morfologías. Los diferentes colores son debidos a los LSP. Derecha: espectros UV-visible de estos coloides.

Si las NPs se encuentran suficientemente próximas, formando agregados, los plasmones se acoplan entre sí dando lugar a resonancias que se encuentran desplazadas también hacia el rojo. Este acoplamiento afecta esencialmente a los modos dipolares.

El acoplamiento de los plasmones con los fotones de una radiación incidente que conduce a condiciones de LSPR, produce un fuerte incremento del campo

electromagnético cercano a la superficie de la nanoestructura. La intensidad del campo decae muy rápidamente desde la interfase metal/dieléctrico, desapareciendo a muy corta distancia al adentrarse en el dieléctrico (el disolvente, en el caso de NPs coloidales).

Dicha amplificación de la intensidad de la luz en la proximidad de la superficie es un aspecto muy importante de la LSPR, puesto que da lugar a un aumento de la sección eficaz para las técnicas espectroscópicas ópticas (absorción infrarroja, Raman y fluorescencia) de aquellas moléculas situadas muy próximas a la superficie del metal. El efecto es similar al de una mayor cantidad de fotones incidiendo sobre estas moléculas, lo cual favorece la probabilidad de que se produzcan los fenómenos de absorción y difusión de luz, aumentando consecuentemente la sección eficaz. Así pues, este efecto da pie a las Espectroscopías Intensificadas por Superficie (*Surface Enhanced Spectroscopies*), de las que trataremos más adelante.

Sin embargo, el incremento del campo electromagnético no es homogéneo sobre todos los puntos de la superficie, sino que se concentra y localiza en determinados puntos conocidos como *hot spots* (HS): puntos de máxima intensificación. En el caso de nanopartículas con morfología esférica, los HS están localizados en los espacios entre partículas situadas a pocas unidades de nanómetro unas de otras^[11-13, 25, 26]. En simetrías no esféricas, los HS se localizan en las zonas de máxima curvatura, como son los vértices de un prisma o las crestas y valles de superficies nanorrugosas^[27, 28]. Así pues, resulta de especial interés controlar la cantidad de HS, y trabajar con superficies plasmónicas con un elevado número de ellos^[29].

Una forma de generar HS en un sistema de NPs es el empleo de ensambladores bifuncionales. Se puede definir un ensamblador bifuncional como toda aquella molécula que contiene dos grupos funcionales situados en extremos opuestos de su estructura. Estos grupos funcionales deben presentar una alta afinidad por los metales empleados en la fabricación de NPs plasmónicas. Esta característica le confiere la posibilidad de unirse a dos superficies metálicas, situadas en NPs diferentes, a través de interacciones con dichos grupos, de tal forma que la parte central de su estructura actúa de puente entre las mismas. Así por ejemplo, determinadas moléculas bifuncionales, como el 4-aminotiofenol o el 1,4-bencenoditiol se han empleado con anterioridad como ensambladores de nanoestructuras plasmónicas usados para crear HS de tamaño controlado entre superficies metálicas planas y nanopartículas^[18-20], mientras que otros compuestos como los viológenos dicatiónicos han sido empleados con el propósito de ensamblar NPs entre sí^[30-32].

2.3 Espectroscopía Raman Intensificada por Superficies (SERS)

El fenómeno de Difusión Raman Intensificada por Superficies, más conocido como SERS por sus siglas en inglés (Surface-Enhanced Raman Scattering), fue descubierto en 1974 por Fleischmann y col.^[33]. Estos autores observaron un notable incremento del espectro Raman de la piridina sobre un electrodo rugoso de plata. Experimentos posteriores demostraron que se trataba de un nuevo fenómeno consistente en la intensificación de la difusión Raman de una molécula en presencia de determinadas superficies metálicas rugosas, por lo que comenzó a ser conocido como SERS^[34]. Sin embargo, desde su comienzo, la microscopía electrónica reveló que la superficie de los sustratos activos en SERS se encontraba nanoestructurada. Más adelante, se demostró la gran actividad como sustrato SERS de nanopartículas metálicas en suspensión coloidal^[35, 36], demostrando que se trataba en realidad de una intensificación “por nanoestructura”.

Al igual que para el Raman, la presencia de NPs metálicas induce la intensificación de otros efectos ópticos como la absorción IR y la emisión de fluorescencia^[5, 7, 37-39]. Sin embargo, el incremento en la sección eficaz de estas técnicas espectroscópicas ópticas es más significativo en el caso del Raman (Figura 2.4), ya que en técnicas de emisión hay un efecto multiplicativo que afecta tanto a la radiación incidente como a la emitida. Además, el tiempo de vida medio del Raman es tan pequeño (del orden del ps) que no se produce atenuación por parte del metal mediante transferencia de energía, como ocurre en el caso de la fluorescencia.

Aparte de la evidente utilidad práctica del SERS, de la que hablaremos más adelante, la naturaleza de esta intensificación ha sido objeto de numerosos estudios teóricos, que han descifrado la auténtica naturaleza de este fenómeno, basado realmente en una intensificación “asistida por plasmones”^[40]. Actualmente, se acepta la existencia de dos mecanismos principales que pueden intervenir en esta intensificación, conocidos como *mecanismo electromagnético* y *mecanismo químico* o *de transferencia de carga*.

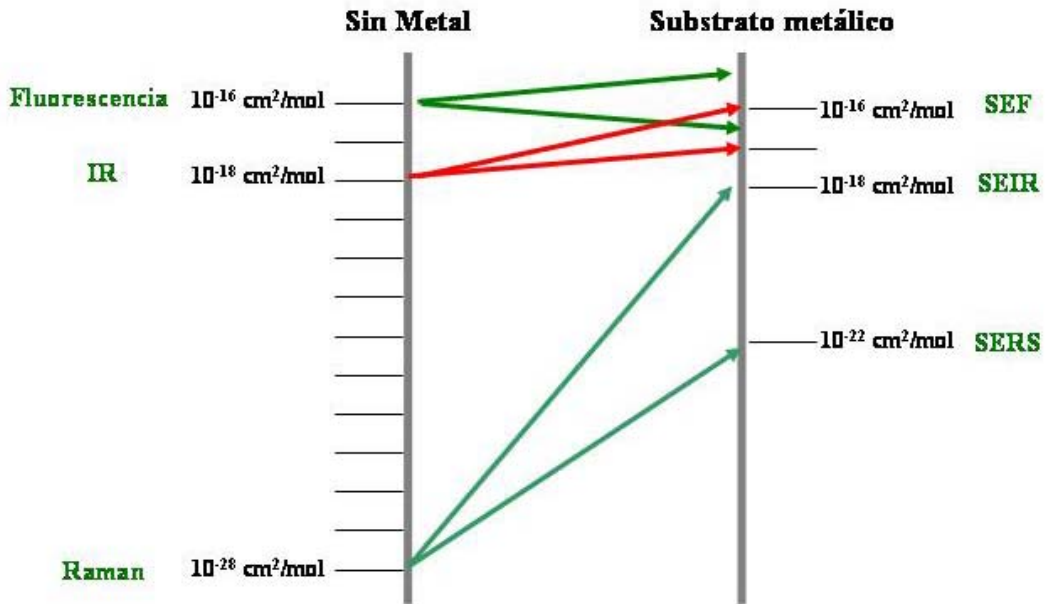


Figura 2.4. Variación de la sección eficaz de las distintas técnicas espectroscópicas con la presencia de sustratos metálicos

2.3.1 Mecanismos de intensificación

A. Mecanismo Electromagnético (EM)

El mecanismo EM sostiene que la intensificación de la señal Raman se debe a la doble intensificación (de la radiación incidente sobre la molécula y la difundida por ella) ejercida por la presencia del metal cuando una molécula se encuentra en las inmediaciones de una superficie metálica nanoestructurada (Figura 2.5). Estas radiaciones son intensificadas por la consiguiente excitación de plasmones de superficie en el metal y resonancia de los LSP^[41]. Así por ejemplo, la intensificación LSPR inducida por una esfera metálica depende de la polarización generada por el campo externo en ella, y del momento dipolar asociado, que viene dado por la expresión^[42]:

$$\vec{p} = a^3 \frac{\varepsilon(\omega) - 1}{\varepsilon(\omega) + 2} \vec{E}_0 = g(\omega) \vec{E}_0 \quad (2)$$

Siendo \mathbf{p} la polarizabilidad de la nube electrónica, $\varepsilon(\omega)$ la permitividad eléctrica del material, \mathbf{E}_0 el campo aplicado y a un parámetro constante. En metales, la parte real de la permitividad puede ser negativa, y en los casos en los que se cumple $\text{Re}[\varepsilon(\omega)] \approx -2$, se tienen las condiciones necesarias para que se produzca una intensificación por LSPR^[39].

En una expresión más general, la condición de resonancia es $\text{Re}[1 + [\epsilon(\omega) - 1]A] \approx -2$, donde A es un factor que depende a su vez de la forma de la NP^[42]. Por tanto, la resonancia de los LSP no sólo depende de la permitividad eléctrica del metal y el tamaño de la NP, sino también de su forma.

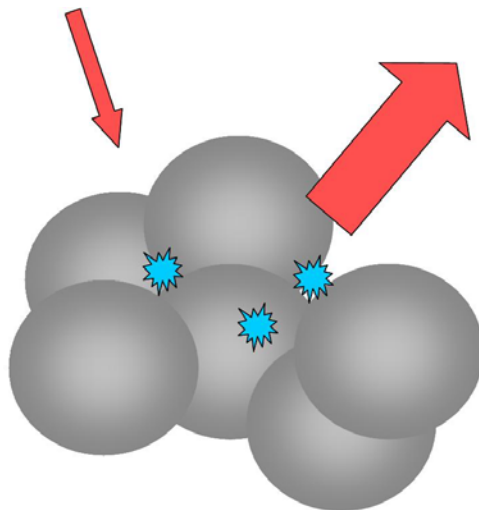


Figura 2.5. Esquema del mecanismo EM de las Espectroscopías Intensificadas por Superficie.

La intensificación del campo en el exterior de la partícula depende directamente del valor de g en la ecuación 2, que es el que gobierna en definitiva el proceso de intensificación de la señal espectroscópica, es decir, las emisiones Raman y fluorescencia y la absorción IR. En la figura 2.4 se representa el aumento de la sección eficaz de estas técnicas por causa de la interacción de las moléculas con superficies plasmónicas. La espectroscopía Raman sale netamente beneficiada de este proceso de intensificación mediado por LSPR como se ha comentado anteriormente (figura 2.4).

Los metales nobles (Au, Ag, Cu) cumplen la condición de resonancia de los LSP expuesta anteriormente, generándose intensos campos electromagnéticos en la superficie de dichos metales por LSPR. Además, debido a su permitividad, los plasmones de superficie de estos metales se excitan irradiando en el visible, lo que resulta muy conveniente ya que existe un gran número de láseres en esta región que son utilizados comúnmente como fuentes de excitación Raman.

En el caso de la esfera, el campo eléctrico externo disminuye con la distancia según $[R/(R+d)]^{12}$, donde R es el radio de la NP y d la distancia al centro de la partícula. Los resultados experimentales indican que la intensificación resulta detectable para distancias menores de $\sim 100 \text{ \AA}$ ^[43, 44]. Este enorme gradiente del campo EM existente sobre la superficie metálica, hace que los modos vibracionales relacionados con los

grupos moleculares del analito que se encuentran más cercanos a la superficie dan lugar a una mayor intensidad SERS con respecto a los grupos más alejados. Este efecto de la proximidad puede ser utilizado para conocer el mecanismo mediante el cual se produce la interacción entre el adsorbato y el metal.

El efecto SERS posee unas reglas de selección distintas a las que se dan en la espectroscopía Raman convencional y pueden ser explicadas dentro del marco del modelo EM. Estas reglas operan sobre los modos vibracionales permitidos en Raman, de manera que establecen una distinción entre unos modos más activos, los cuales aparecerán con una mayor intensidad en el espectro SERS, y otros menos activos y menos intensos. En el exterior de la partícula metálica responsable del efecto SERS, las intensidades del campo polarizado paralelamente (E_t) y perpendicularmente (E_n) a la superficie metálica, no poseen el mismo valor relativo. La relación que guardan ambas magnitudes depende de la longitud de onda de excitación; así, a una longitud de onda cercana a la de excitación de los plasmones superficiales del metal, se cumple que $\text{Re}(\epsilon) \approx -2$, de donde se deduce que $E_n \approx 4E_t$. Esta característica constituye una herramienta de una gran utilidad en la determinación de la orientación de la molécula sobre la superficie, ya que los modos vibracionales perpendiculares a la superficie se ven más intensificados que los modos orientados en dirección paralela^[45].

B. Mecanismo de Transferencia de Carga

En las moléculas que son quimisorbidas sobre la nanoestructura (debido a la presencia de grupos funcionales de elevada afinidad por la superficie del metal), un segundo mecanismo de intensificación conocido como *de transferencia de carga* (CT) puede contribuir a la intensificación SERS observada en presencia de metales plasmónicos. Este mecanismo se basa en la formación de un enlace metal-molécula similar al que se tiene en complejos metálicos, posibilitando entonces la existencia de transferencia electrónica entre el metal y orbitales moleculares HOMO y LUMO del complejo con la superficie^[37, 46].

La radiación de excitación empleada para obtener el Raman puede excitar un electrón del nivel de Fermi del metal al nivel LUMO de la molécula o bien del HOMO de la molécula al metal en un proceso que implica la transferencia electrónica entre ambos sistemas con la formación de un par electrón-hueco. Cuando se produce la relajación hacia el nivel electrónico fundamental, el electrón puede alcanzar un nivel

vibracional diferente al fundamental, por lo que la radiación se emite a una frecuencia distinta cuya diferencia respecto a la radiación incidente coincide con la frecuencia de la vibración del nivel de llegada. Así pues, el mecanismo de transferencia de carga es muy similar al fenómeno de resonancia Raman. El factor de intensificación debido a este mecanismo es del orden de 10^3 [47].

En lo referente al perfil espectral de las moléculas quimisorbidas, la simetría de las mismas se altera al combinarse con los átomos de la superficie de la nanoestructura metálica, lo que puede producir desplazamientos de frecuencias en las bandas vibracionales.

2.3.2 Factor de Intensificación SERS

En este contexto, es importante definir un factor de intensificación SERS (enhancement factor, EF)^[11], que es el factor de amplificación que experimenta la señal Raman de una molécula al encontrarse en las proximidades de una nanoestructura. El EF puede ser calculado mediante la siguiente expresión:

$$EF = \frac{I_{SERS}}{I_{Raman}} \cdot \frac{C_{Raman}}{C_{SERS}} \quad (3)$$

Siendo I_{SERS} e I_{Raman} las intensidades de una determinada banda marcadora en SERS y Raman convencional; mientras que C_{SERS} y C_{dis} son las concentraciones de la molécula estudiada en las muestras empleadas para el registro de los espectros SERS y Raman convencional. Este factor es un indicador de la intensificación inducida por un determinado sustrato, y dependerá no sólo del intenso campo electromagnético producido por los plasmones de superficie, sino también de la afinidad de la molécula por la nanoestructura, que favorecerá su adsorción a bajas concentraciones. La adsorción de la molécula en la superficie plasmónica es imprescindible, ya que dicho campo tiene un corto alcance.

2.3.3 Interpretación de los espectros SERS

La presencia de la superficie metálica induce cambios evidentes en la molécula y en su entorno que se manifiestan a través de modificaciones del perfil de los espectros SERS. Estos cambios afectan a las siguientes propiedades de los espectros:

a) Intensidad absoluta del espectro SERS en relación al espectro obtenido en ausencia de metal (debido al aumento de sección eficaz Raman);

b) Intensidad relativa de las bandas de una misma molécula, por el efecto resonante del plasmón y del complejo adsorbato-metal, por el cambio químico que sufre el adsorbato al interactuar covalentemente con él, y también por el efecto de las reglas de selección anteriormente mencionadas;

c) Anchura de bandas, por ensanchamiento inhomogéneo debido a la existencia de gran número de estados moleculares distintos sobre la superficie del metal;

d) Aparición de nuevas bandas, por formación del complejo adsorbato-metal y posible aparición de bandas prohibidas por las reglas de selección Raman, que se vuelven activas por excitación de cuadrupolos^[48].

En consecuencia, el análisis del espectro SERS puede aportar información, no sólo de la estructura de la molécula adsorbida sobre el metal, sino también de su orientación respecto a la superficie.

Por otra parte, el mecanismo de interacción y la orientación de la molécula sobre la superficie pueden cambiar si cambian las condiciones del medio, es decir, si se modifican factores como la concentración del adsorbato o el pH. También el empleo de superficies distintas induce cambios distintos sobre los espectros SERS debido a las variables físico-químicas de las nanoestructuras (plasmones distintos) y de las interfases (naturaleza del metal y presencia de otras especies en la superficie).

2.3.4 Substratos SERS

Un substrato SERS se caracteriza por presentar una superficie metálica con plasmones activos que da lugar a una gran intensificación del campo electromagnético cercano por LSPR.

La elección del substrato SERS adecuado se realiza bajo los criterios de máxima amplificación de la señal y óptima reproducibilidad. Los substratos tradicionales

utilizados hasta la fecha son electrodos de superficie rugosa obtenida a partir de ciclos de oxidación-reducción^[2], suspensiones de nanopartículas o coloides metálicos^[49, 50], películas de islotes metálicos^[36] y nanoestructuras litografiadas sobre una superficie^[51].



Figura 2.6. Izquierda: Láser enfocando en un electrodo de Ag de una microcélula electroquímica. Derecha: Suspensiones coloidales de nanopartículas de Au (rojo) y Ag (beige).

Los electrodos rugosos son sustratos en los que se realizan medidas reproducibles in situ con factores de intensificación moderados ($\sim 10^6$). Las películas de islotes metálicos son fáciles de fabricar, y la longitud de onda de sus LSPR puede sintonizarse variando el espesor de la película. Sin embargo, los factores de intensificación que se obtienen con ellos son, en general, inferiores a los de otros sustratos ($\sim 10^4 - 10^5$). Las técnicas de nanolitografía son relativamente recientes en la fabricación de sustratos SERS, siendo su principal ventaja el control de la forma y la posición de las nanoestructuras, y con ello, de la longitud de onda de los LSPR y la formación de *hot spots*. Con estos sustratos se han observado factores de intensificación de hasta 10^8 . Algunos ejemplos de sistemas metálicos nanoestructurados empleados en esta Tesis se muestran en la figura 2.6.

Los coloides metálicos se emplearon por primera vez como sustratos SERS en 1979^[35], y desde entonces, se han convertido en las estructuras más ampliamente utilizadas. Su fabricación no requiere instrumentación sofisticada, y generan factores de intensificación muy altos (hasta 10^{11}). De hecho, son los sustratos empleados en los experimentos que han llevado a la detección de moléculas aisladas (SMD)^[8, 52-54].

Los coloides metálicos se preparan por reducción química o fotoquímica de una sal del correspondiente catión, generalmente en disolución acuosa. Hasta ahora los

coloides metálicos empleados en SERS consistían en suspensiones acuosas de nanoesferas de oro, plata o cobre. Sin embargo, en los últimos tiempos se han fabricado otros sistemas con morfologías diferentes, cuyo uso está justificado por los cálculos teóricos del campo generado sobre estas nanoestructuras, que predice una mayor intensificación en zonas con mayor curvatura, como vértices o recovecos, que en la superficie de nanopartículas esféricas ^[55-57].

Así, en la última década ha aparecido en la literatura un número cada vez mayor de métodos de síntesis de NPs con diferentes formas en medio acuoso. Los procesos de síntesis descritos tienen dos objetivos principales: el de obtener coloides estables de NPs con formas y tamaños monodispersos, o el de obtener NPs con un mayor número de vértices y recovecos, en los que la intensificación del campo electromagnético es mayor, aunque no tengan una forma muy homogénea. Entre las nanopartículas fabricadas destacan las nanovarillas ^[58], nanoprismas triangulares y hexagonales ^[59], nanocubos ^[60] y nanoestrellas ^[61].

Las NPs individuales son en general muy poco activas en SERS. El ensamblaje de diferentes NPs para dar lugar a agregados de mayor tamaño resulta ser muy ventajoso en experimentos SERS. Esto es debido al fuerte acoplamiento de plasmones superficiales de las diferentes NPs con formación de gran número de *hot spots*, o zonas de máxima intensificación, en los espacios interpartícula (Figura 2.5). En un coloide metálico, la formación de agregados puede inducirse simplemente por la adición de una pequeña proporción de una sal iónica (p.e., NaCl o KNO₃), ya que al adsorberse los aniones en la superficie se neutraliza en parte la carga superficial de las NPs y disminuyen las fuerzas repulsivas.

Cuando se elige un coloide metálico como sustrato, existen dos formas de realizar un experimento SERS:

a) SERS promediado: se registra la señal de un conjunto numeroso de NPs en la suspensión.

b) SERS de una sola nanopartícula o un solo agregado, destinado al estudio de moléculas aisladas y de *hot spots*.

El uso de suspensiones coloidales para estudios SERS promediados presenta varias ventajas. La presencia del disolvente disminuye el riesgo de fotodegradación de la muestra con el láser, permitiendo el uso de potencias superiores y de líneas de excitación más energéticas. Además, los espectros obtenidos son un promedio de las señales de un amplio conjunto de NPs, debido al movimiento Browniano de las mismas

en la suspensión coloidal. Por lo tanto, se registran espectros reproducibles que son huellas dactilares características de la molécula y el metal como conjunto. Asimismo, el ensamblaje de estos sistemas pueden ser dirigido convenientemente mediante el uso de sustancias ensambladoras, como se verá más adelante. Por estos motivos, los coloides metálicos han sido empleados en esta Tesis para llevar a cabo la consecución de los objetivos propuestos.

2.4 Adsorción molecular sobre superficies

Como se ha explicado con anterioridad, la intensificación inducida por el efecto SERS es de muy corto alcance; ya que depende de R^{-12} siendo R la distancia de la molécula al metal. Por lo tanto, es necesario que la molécula a analizar se encuentre muy cerca de la superficie para que el experimento SERS tenga éxito. En la práctica, el efecto de proximidad en SERS requiere la adsorción del analito sobre la superficie para que ésta se encuentre lo suficientemente cerca de la NP como para ser afectada por el campo electromagnético cercano a la misma ^[62]. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha prestado la suficiente atención a los procesos de adsorción que tienen lugar sobre las nanopartículas empleadas en SERS, a pesar de su notable importancia. Por consiguiente, en esta Tesis se ha realizado un estudio de la adsorción tanto de analitos como de moléculas funcionalizadoras sobre las NPs metálicas.

2.4.1. Modelos de adsorción

El efecto de superficie inherente al fenómeno SERS hace necesario un análisis detallado de aquellos procesos relacionados con la adsorción de una molécula sobre una superficie. Existen varios modelos teóricos que describen la adsorción como un equilibrio entre especies adsorbidas y desorbidas, siendo el más sencillo el que supone la formación de una monocapa de adsorbato sobre la superficie cuando la interacción entre las moléculas del mismo es despreciable. Según este modelo, formulado por Langmuir en 1937^[63], la adsorción de una molécula sobre una superficie tiene lugar en dos pasos:

- i) Difusión de la molécula desde el seno de la disolución hasta la interfase.
- ii) Adsorción en la superficie por interacción electrostática (fisorción) o por formación de un enlace químico (quimisorción).

La cinética de un proceso de adsorción estará controlada por el proceso más lento de entre éstos. A bajas concentraciones, generalmente el factor limitante será la velocidad de difusión de la molécula en la disolución. A elevadas concentraciones, la difusión hacia la interfase es más probable y entonces la adsorción está condicionada por la energía de interacción entre adsorbato y superficie.

El proceso de adsorción puede considerarse como un equilibrio químico entre la especie adsorbida y la libre:



Siendo A el adsorbato y * un hueco disponible en la superficie. Este equilibrio está regido por la *constante de adsorción*, K_{ad} , de tal forma que cuando la interacción entre la molécula y la superficie está termodinámicamente muy favorecida el equilibrio se desplaza hacia la derecha y un mayor número de moléculas son adsorbidas en la superficie, y viceversa. En el modelo de Langmuir, este proceso continúa hasta que la superficie está recubierta completamente por una monocapa de la molécula, que es cuando se alcanza una saturación. Dicho modelo implica la ausencia de interacción entre moléculas adsorbidas, y no es aplicable en todos los casos.

En 1938, Brunauer, Emmet y Teller elaboraron una extensión de esta teoría para moléculas que, además de con la superficie, son capaces de interaccionar unas con otras dando lugar a la adsorción de capas sucesivas^[63, 64], que pasó a conocerse como modelo B.E.T.(Figura 2.7).

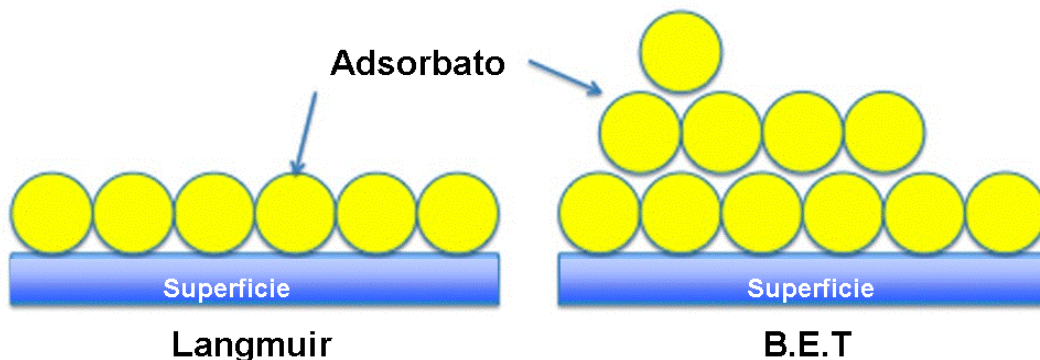


Figura 2.7. Modelos de adsorción de moléculas en superficies

En general se tiene que la adsorción aumenta con la concentración de la molécula en el medio. Los modelos de adsorción propuestos hasta la fecha predicen también una variación con la temperatura del medio, por lo que las curvas que describen la variación de la concentración superficial (ϕ , en mol/cm²) con la concentración en disolución ($[A]$, en mol/L) se refieren a una temperatura constante y, por ello, son denominadas *isotermas*. La isoterma de Langmuir está bien definida y depende exclusivamente de una constante de interacción: la K_{ad} . Su forma más sencilla permite la obtención de la *fracción de recubrimiento* (θ), de la superficie, que es la relación entre la concentración superficial y la concentración de saturación ϕ_0 :

$$\theta = \phi / \phi_0 = \frac{K_{ad} [A]}{1 + K_{ad} [A]} \quad (4)$$

Sin embargo, mecanismo de tipo B.E.T. presenta dos constantes de interacción: la K_{ad} y una K_2 debida a la interacción de las moléculas de adsorbato entre sí, dando lugar a la formación de multicapas. En función de las proporciones entre K_{ad} y K_2 , pueden encontrarse cinco tipos de isothermas de adsorción, que se muestran en la Figura 2.8.

- 1) Sólo K_{ad} : Isotherma de Langmuir
- 2) $K_{ad} \gg K_2$: B.E.T. Saturación a monocapa y posterior formación de multicapas.
- 3) $K_{ad} \ll K_2$: Las capas posteriores comienzan a formarse antes de la formación de una monocapa.
- 4) Tipo 2 con saturación (no se generan infinitas multicapas). Muy poco común.
- 5) $K_{ad} \approx K_2$: Tipo 3 con saturación.

Esta clasificación recibe el nombre de B.D.D.T. y es debida a Brunauer, Deming, Deming y Teller ^[65].

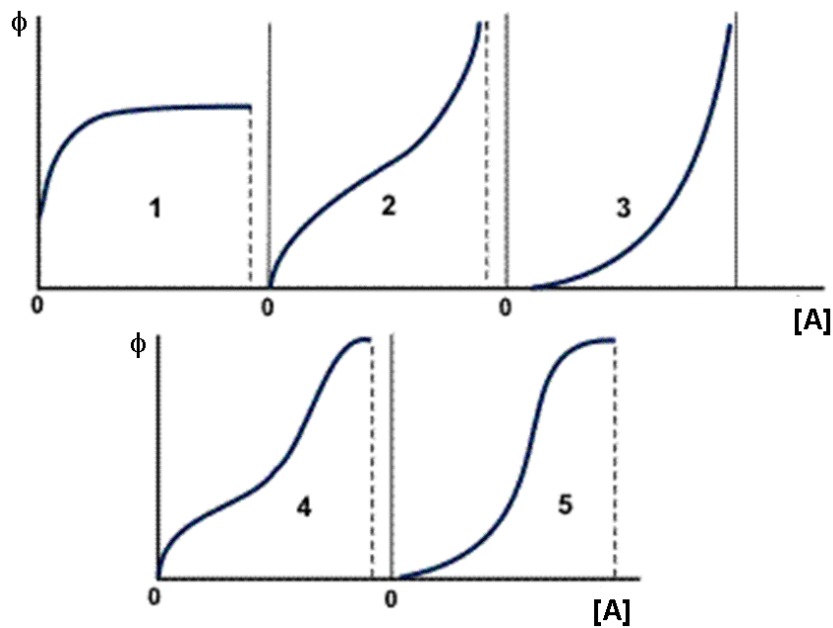


Figura 2.8. Clasificación B.D.D.T. de las isothermas de adsorción.

2.4.2. Adsorción directa y funcionalización para SERS

En el caso de los sistemas que forman parte de un experimento SERS, las propiedades ópticas y químicas de la superficie están supeditadas a la naturaleza del metal empleado, la morfología y el tamaño de la nanoestructura y la composición de la

interfase. Así pues, la afinidad de las moléculas por distintos coloides, es decir la K_{ad} , será diferente.

La adsorción directa de una molécula sobre una superficie plasmónica sólo es posible cuando la molécula presenta algún tipo de afinidad por el metal, debido a la presencia en su estructura de grupos funcionales afines a los metales plasmónicos, favoreciendo su adsorción mediante una interacción electrostática o covalente.

Sin embargo, en muchos casos, las moléculas objeto de estudio no presentan ninguna afinidad por la superficie de los metales, por lo que resulta imposible realizar un espectro SERS de las mismas cuando se ponen en presencia de la superficie. En estos casos se hace necesario desarrollar algún tipo de estrategia destinada al aumento de afinidad del analito por la superficie. Una de las estrategias más usadas es el empleo de moléculas intermediarias o *funcionalizadores*. Estas moléculas modifican las propiedades químicas de las nanopartículas (aumentando la afinidad de la sustancia respecto al metal) sin provocar cambios significativos en sus propiedades ópticas. Los agentes funcionalizadores deben cumplir varias condiciones: a) una buena adherencia sobre la superficie metálica, b) la existencia o formación de cavidades intra- o intermoleculares capaces de albergar el ligando^[66] y c) no presentar un espectro SERS intenso cuyas bandas puedan enmascarar las del analito a estudiar. Otro objetivo que se persigue con la funcionalización de NPs es la protección de las mismas para evitar efectos adversos en la identificación de analitos, como son los procesos catalíticos que pueden a veces inducir los metales sobre los analitos menos estables.

Los mecanismos de interacción de los agentes receptores con el analito son fundamentalmente tres: a) inclusión, cuando la molécula intermediaria presenta una cavidad intramolecular (estos compuestos reciben también el nombre de *cavitands* en inglés), que permite incluir en su interior el analito; b) contacto, cuando la interacción se produce sin cavidad, aunque es posible la formación de una cavidad intermolecular formada por ensamblaje de varias moléculas; y c) oclusión, cuando la molécula receptora es suficientemente grande como para albergar el analito en cavidades que se adaptan estructuralmente al mismo.

2.4.3. Propiedades interfaciales de las nanopartículas metálicas

Las NPs metálicas presentan una superficie con cargas positivas debido a una transferencia de los electrones de los átomos de la superficie hacia el medio que los circunda^[67]. La carga residual de las NPs genera una capa sobre la misma (capa de Stern) integrada por contraiones rígidamente unidos a la superficie del metal. En un sistema de NPs se va a encontrar una máxima concentración de contraiones cerca de la superficie, que disminuye gradualmente con la distancia (formando la *capa de difusión*) hasta alcanzar un equilibrio con la concentración en el seno de la disolución, distancia que se considera el límite de la interfase. En coloides metálicos, la composición de esta interfase depende del método de síntesis de las NPs, ya que los iones presentes en el medio provienen del reductor empleado. La existencia de especies moleculares o iónicas sobre la superficie afecta de manera importante a la adsorción del analito sobre ella. En el caso de nanopartículas esféricas y nanovarillas, sus propiedades interfaciales han permitido su uso con éxito en detección cuantitativa. Sin embargo otras nanopartículas con una morfología en teoría más apropiada para llevar a cabo la detección sensible mediante SERS, como nanoprismas, nanocubos o nanoestrellas, presentan dificultad para adsorber moléculas en su superficie por las características de sus interfases. Así, por ejemplo, la preparación de nanoprismas requiere del empleo de tensioactivos o de polímeros encapsulantes que se adsorben con fuerza sobre la superficie del metal, impidiendo la aproximación de analitos a ésta.

La estabilidad de los coloides metálicos está gobernada por un balance entre fuerzas atractivas tipo Van der Waals y fuerzas electrostáticas repulsivas entre NPs cargadas eléctricamente, según la teoría DLVO (llamada así por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek)^[67].

La adsorción de moléculas sobre las NPs produce un cambio en la densidad de carga superficial, que altera por tanto la estabilidad del coloide. Al rebajarse la carga superficial, la repulsión entre NPs disminuye, y éstas tienden a agregarse entre sí. En consecuencia, como se adelantó en las secciones 2.2 y 2.3, se produce un desplazamiento hacia el rojo de la resonancia del plasmón en el coloide, y se crean *hot spots* en los espacios interpartícula de los agregados, lo que facilita su detección por SERS.

2.5 Detección molecular basada en espectroscopía SERS

Como hemos visto hasta ahora, durante los más de treinta años que han transcurrido desde el descubrimiento del SERS, esta técnica ha evolucionado formidablemente. Así, desde el estudio de moléculas sobre electrodos rugosos de plata se ha pasado al desarrollo de sistemas nanoestructurados sofisticados para la detección molecular con el fin de fabricar sensores efectivos e incluso llegar a la detección unimolecular^[8, 68, 69].

La fabricación de un sensor basado en la espectroscopía SERS requiere que la técnica cumpla una serie de requisitos como selectividad, sensibilidad y reproducibilidad. La espectroscopía SERS presenta la doble ventaja de una elevada sensibilidad combinada con identificación molecular específica. Aunque durante mucho tiempo se presentó sólo como una técnica prometedora, actualmente se emplea ampliamente como mecanismo de transducción de señal para detección en Química y Biología. Se pueden encontrar ejemplos de análisis por SERS de trazas de pesticidas^[70, 71] y otros contaminantes^[72, 73], compuestos de interés forense^[74] y médico (antígenos, glucosa, fármacos)^[75-77], desechos nucleares^[78] y en el estudio del Patrimonio Histórico^[79]. También se ha implementado la técnica en identificación bacteriana^[80], diagnóstico genético^[81] y para etiquetado en inmunoensayos^[82-84]. La comercialización de instrumentos Raman portátiles, por otro lado, facilita la utilización de la técnica para análisis *in situ*, tanto análisis clínico como en ambientes urbanos específicos^[85].

En análisis de trazas, la optimización de las condiciones experimentales para obtener una señal identificable y reproducible es un factor crítico. Por tanto, para obtener información cuantitativa mediante SERS, es imprescindible preparar un medio de intensificación reproducible y registrar los espectros en la forma de SERS promediado. Es también crucial llevar a cabo un análisis estadístico apropiado y el empleo de patrones internos o bandas de referencia en intensidad que dependen del método empleado: sustrato, agregante, etc. A veces se adicionan a la mezcla sustancias exógenas que sirven de patrón de referencia para la medida de las intensidades SERS^[86]. En la práctica la aplicación de la técnica SERS en la detección de un analito particular exige la selección de las condiciones experimentales específicas para ese compuesto por sus peculiaridades físico-químicas, que afectan tanto la difusión como la adsorción sobre la superficie metálica.

En este aspecto, un primer factor a tener en cuenta será la elección del sustrato, puesto que la adsorción de una determinada molécula sobre la superficie de un metal viene definida por la afinidad por el metal y por la composición de la interfase.

Del mismo modo, una molécula que no presente afinidad por los metales sólo podrá ser detectada realizando una funcionalización previa de la superficie. En trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro grupo se ha trabajado de manera extensa y profusa en la funcionalización de nanopartículas con diferentes receptores como calixarenos, viológenos, alquildiaminas o moléculas biológicas [14, 72, 79, 87, 88]. El trabajo llevado a cabo en este sentido se ha dirigido hacia la consecución de receptores moleculares adaptados a los analitos que se pretende estudiar, mediante la variación de las cavidades intra- e intermoleculares y mediante modificación del anclaje del receptor al metal. Este anclaje ha merecido una especial atención ya que determina en gran medida la efectividad de la técnica SERS. Uno de los grupos que presenta mayor afinidad por superficies de Au y de Ag en NPs en suspensión acuosa es el ditiocarbamato (DTC) [89]. La inclusión de este grupo en la estructura del funcionalizador ha permitido mejorar el anclaje de ensambladores como los calixarenos [14, 72].

En definitiva, la funcionalización de NPs permite una modificación de las propiedades químicas de la superficie con el propósito de servir como nanosensores SERS aplicables en la detección de moléculas difícilmente detectables mediante esta técnica [15, 29-31, 66, 72, 88, 90-94].

En esta Tesis se han desarrollado sistemas dirigidos a la detección de fármacos, concretamente sustancias de dopaje deportivo, pero, como se verá más adelante, algunos sistemas también han sido ensayados con sustancias de interés medioambiental, como el pesticida aldrín, para hacer más extensiva su posible aplicación analítica.

2.6 Sustancias de dopaje deportivo

El dopaje deportivo, también conocido como *doping*, se define como el consumo de sustancias para incrementar el rendimiento en un deporte. Estas sustancias serán denominadas en esta Tesis sustancias de dopaje deportivo (SDD). El problema del dopaje en el deporte fue reconocido por primera vez en la década de 1920, cuando la Federación Internacional de Atletas Aficionados (IAAF) prohibió el consumo de estimulantes, a pesar de carecer de un método para detectarlos. En 1967, el Comité Olímpico Internacional formó una comisión médica con el fin de tratar el aumento que se había percibido en el consumo de drogas y otras sustancias que aumentaban el rendimiento, que no sólo afectaban al espíritu del deporte, sino que suponían un riesgo para la salud de los deportistas. En 1982, el COI llegó a un acuerdo con la IAAF que resumía un conjunto de criterios para acreditar los laboratorios *antidoping* ^[95].

La Agencia Mundial Antidopaje (AMA) fue creada en 1999 con la intención de promover, coordinar y monitorizar la lucha contra el dopaje. Se trata de una Agencia independiente constituida por representantes de asociaciones de deportistas, incluido el COI, y varios gobiernos. La AMA coordinó la creación e implementación del Programa Mundial Antidopaje, que fue aprobado en 2002. Las sustancias cuyo consumo por deportistas que se presenten a competición oficial está prohibido o regulado se recogen en la *Lista Prohibida: Criterio Internacional* ^[96], editada por la AMA, cuyo contenido se revisa cada año. Con el fin de incluir la regulación antidopaje en las leyes nacionales, la UNESCO participó como intermediaria en la presentación de los códigos en su convención internacional en 2007. Las normas antidopaje forman parte actualmente de los reglamentos oficiales de los deportes.

En los primeros años de la implantación de análisis de sustancias de dopaje en competiciones deportivas, la técnica empleada era siempre cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC/MS). El desarrollo de las técnicas cromatográficas y de los espectrómetros de masas ha permitido que un número cada vez mayor de drogas se puedan analizar a las bajas concentraciones en que aparecen en el organismo. Del mismo modo, electroforesis, inmunoensayos y citometría en flujo han cobrado mayor importancia en análisis de SDD. Así pues, las técnicas analíticas disponibles para la detección de estas sustancias han aumentado drásticamente su número en la última década ^[97-100] y se encuentran aún en crecimiento.

Paralelamente al avance en regulación y detección de SDD, con los recientes avances en el campo de la biomedicina, ha aparecido una nueva generación de las mismas. Un reto analítico adicional surge del hecho de que, al enfrentarse a un test de doping, muchos deportistas tratan intencionadamente de evitar la detección y enmascarar la presencia de sustancias prohibidas en su organismo, en algunos casos con la ayuda de médicos o científicos que les proporcionan los medios.

En esta Tesis se ha empleado la técnica SERS con el fin de desarrollar métodos de detección de diferentes SDD de estructura no polimérica. Este objetivo requiere de una correcta interpretación previa de los espectros vibracionales (IR y Raman) de estas sustancias. Sin embargo, se ha encontrado que en muchos de los casos estudiados no existía un estudio vibracional de los mismos, por lo que ha sido necesario llevar a cabo una caracterización vibracional de estos compuestos. Este estudio previo ha consistido en la obtención de los correspondientes espectros de vibración y el estudio teórico por cálculos DFT de estas moléculas para ayudar en la asignación de los espectros Raman registrados sobre NPs.

Las SSD estudiadas en esta Tesis pertenecen a varios grupos catalogados según su efecto en el organismo: agonistas de los receptores adrenérgicos β_2 (clenbuterol, salbutamol, terbutalina); el inhibidor de aromatasa aminoglutetimida; el diurético probenecid, empleado en enmascaramiento de otras SDD; y, por último, el esteroide anabolizante nandrolona. Las características estructurales y funciones biológicas de estas moléculas se encuentran detalladas a continuación.

2.6.1 Agonistas de los receptores adrenérgicos β_2

Los agonistas de los receptores adrenérgicos β_2 ($\text{AA}\beta$) actúan sobre la enzima adenil ciclasa, aumentando su actividad vasodilatadora y provocando un aumento en la masa y en la velocidad de contracción del músculo estriado. También produce la relajación del músculo liso, actuando sobre los bronquios y facilitando la respiración en asmáticos. Sus efectos secundarios son en general de mínima importancia por lo que son utilizados en farmacología como medicación a largo plazo para el tratamiento sintomático del asma. En el dopaje deportivo se aprovecha su función como anabolizantes no esteroideos. Esto se debe a su capacidad de disminuir la grasa

acumulada y aumentar la masa muscular. También por este motivo han sido utilizados para potenciar el crecimiento del ganado ^[101].

La estructura de estas moléculas está compuesta por una parte aromática y una cadena alifática (Figura 2.9). Todas ellas tienen en común la parte alifática de la molécula, es decir el grupo 2-(*tert*-butilamino)-1-hidroxi-etilo, diferenciándose en los sustituyentes del anillo bencénico. Tres moléculas correspondientes a este grupo se han estudiado en este trabajo: clenbuterol, salbutamol y terbutalina.

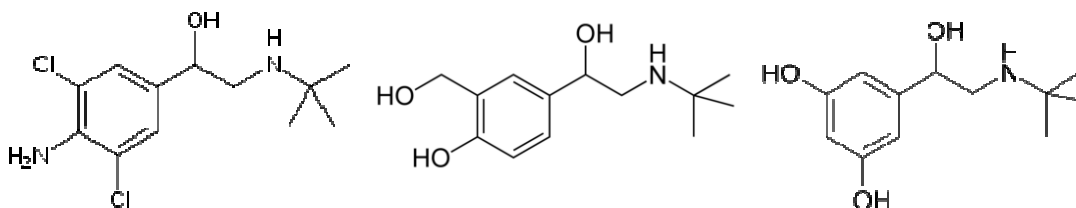


Figura 2.9. Fórmulas estructurales de clenbuterol, salbutamol y terbutalina, respectivamente.

El clenbuterol es ampliamente conocido por su uso en ganadería. Se trata de un fármaco de más larga vida que los otros dos, permaneciendo en el organismo hasta 35 horas después de su consumo. Este compuesto se ha hecho tristemente famoso recientemente, ya que el ciclista Alberto Contador dio positivo por clenbuterol en un test de dopaje durante el Tour de Francia de 2010. En España el salbutamol inhalado está permitido en competiciones nacionales sólo bajo Autorización de Uso Terapéutico y apareciendo en una concentración en sangre inferior a 1 ppm^[102]. En casi todos los países los reglamentos aplican este mismo criterio para la terbutalina, aunque en EEUU está prohibida incluso para uso terapéutico. Los estudios vibracionales de estas moléculas son escasos. De hecho, de estas tres moléculas sólo la terbutalina ha sido objeto de una investigación más exhaustiva mediante espectroscopía vibracional ^[103, 104]

2.6.2 Aminoglutetimida

La aminoglutetimida (AGI) es un inhibidor de la aromatasa, una enzima tipo citocromo P-450, que produce estrógenos por aromatización de sus precursores androgénicos, testosterona o androstendiona. Se utiliza clínicamente en el tratamiento del cáncer de mama y en el del síndrome de Cushing ^[105].

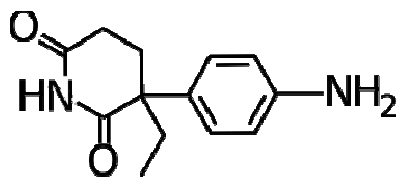


Figura 2.10. Fórmula estructural de la aminoglutetimida

La estructura de AGI es parecida a la de los AA β , con una parte aromática de naturaleza anilínica y otra estructura cíclica alifática con un grupo glutarimida (Figura 2.10).

En culturismo y otros deportes se abusa de esta droga para disminuir los niveles de cortisol en la circulación y prevenir la pérdida de masa muscular. Uno de los efectos de AGI está relacionada con la disminución del nivel de cortisol, que es una hormona esteroidea que actúa como agente catabólico de las proteínas musculares^[106]. Dosis elevadas de AGI ejercen un bloqueo efectivo de la aromatasa y disminuyen la cantidad de cortisol evitando la pérdida de músculo. Los enantiómeros de este fármaco tienen propiedades diferentes: el isómero D (R+) es 30 veces más potente que el L para bloquear la aromatasa, por lo que fue el que se escogió para este trabajo.

Los espectros vibracionales de esta molécula fueron estudiados con detalle por Glice y colaboradores^[107, 108], si bien sus trabajos están centrados en asignaciones del espectro infrarrojo y restan importancia al estudio de los espectros Raman.

2.6.3 Probenecid

Probenecid es el nombre común del ácido p-(dipropilsulfamil) benzoico (Figura 2.11) Su función biológica principal es diurética, aunque se ha comprobado que su consumo disminuye la excreción de otras drogas de dopaje deportivo a través de la orina^[109], manteniéndose en el organismo durante más tiempo y evitando su aparición en los test *antidoping*. Así pues, puede utilizarse como agente enmascarante del consumo de otras sustancias, y también se encuentra entre las sustancias de la Lista Prohibida^[110].

Se distinguen en su estructura una porción aromática con un sustituyente ácido carboxílico, y una porción alifática integrada por dos grupos propilo, unidas entre sí por un grupo sulfonamida (Figura 2.11). Para este compuesto no se han encontrado estudios vibracionales previos a la realización de este trabajo.

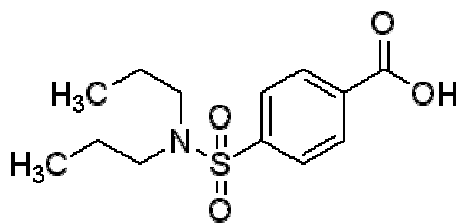


Figura 2.11. Estructura molecular de probenecid

2.6.4 Nandrolona

La nandrolona es un esteroide de función anabolizante, es decir, favorece la generación de tejido muscular ante la ingesta de proteínas. Tanto a nivel de estructura como de función biológica se trata de una sustancia muy similar a la testosterona, si bien la nandrolona produce una menor androgenización^[111, 112]. Al tratarse de un metabolito que puede tener carácter endógeno, el Comité Olímpico Internacional fija un límite de nandrolona en orina de 2 ng/mL (2 ppb)^[113].

Su estructura, completamente alifática, presenta cuatro anillos alicíclicos condensados (Figura 2.12). Los únicos heteroátomos presentes en la estructura son los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo e hidroxilo

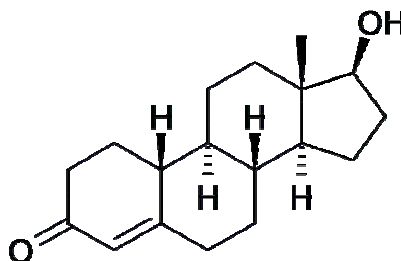


Figura 2.12. Estructura molecular de la nandrolona

2.6.5 Detección de Sustancias de Dopaje Deportivo

Para evitar segundas interpretaciones de la norma, la mayor parte de las sustancias de la Lista Prohibida están prohibidas en absoluto, de tal forma que un resultado positivo es antirreglamentario independientemente de la concentración a la que se haya encontrado la sustancia^[110]. Las únicas sustancias en las que se admite hasta una concentración dada son aquellas que pueden tener origen endógeno o aquellas para

las que se permita presentar una Autorización de Uso Terapéutico. Las SDD surten efecto en el organismo cuando se encuentran en la orina o la sangre a concentraciones de $\mu\text{g/mL}$ (ppm) o inferiores, por lo que es necesario emplear técnicas de gran sensibilidad para su detección.

La normativa Estándar Internacional de Laboratorios cita específicamente la espectrometría de masas (MS) acoplada o bien a cromatografía de gases (GC) o a cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) como método de referencia para la detección de cualquier sustancia de dopaje^[114]. Este es probablemente el motivo de que esta técnica sea la más ampliamente utilizada hasta la fecha para la detección de todas las sustancias estudiadas en esta Tesis. Se trata de una técnica muy fiable que combina la identificación molecular con una gran sensibilidad, aunque lenta, y económicamente muy costosa. Los límites de detección alcanzables, del orden de los pg/mL (o “*parts per trillion*”, ppt) están muy por debajo de los límites de actividad de dichas sustancias en el organismo. Por otra parte, la electroforesis capilar (CE) es la técnica que más se ha desarrollado en los últimos años como alternativa para la detección de SDD, presentando la ventaja de una respuesta más rápida, pero no permite la detección unívoca del compuesto ya que no aporta información molecular.

Pueden encontrarse en la bibliografía estudios analíticos por cromatografía acoplada a espectrometría de masas y por electroforesis capilar de agonistas β_2 ^[115-125], aminoglutetimida^[126-128], probenecid^[120-122] y nandrolona^[123-127]. Estas dos últimas sustancias pueden ser detectadas por HPLC/MS a concentraciones de nanogramos por litro.

La espectroscopía SERS presenta las ventajas de la espectrometría de masas, pero resulta menos costosa. Ha sido empleada para medidas *in situ* de muestras complejas^[129], por lo que se presenta como una técnica que podría reducir también el tiempo empleado en el análisis, al no ser necesaria una separación previa por cromatografía.

Debido a la variedad estructural de los compuestos estudiados, se han adoptado dos estrategias diferentes para su detección: a) detección directa por contacto con nanopartículas, en los casos en los que ha sido posible una adsorción espontánea; y b) funcionalización con ciclodextrinas, cuando el compuesto no presentó ninguna afinidad por las NPs.

Muchas de las SDD estudiadas en este trabajo son capaces de interactuar con ciclodextrinas en disolución^[120, 128, 130, 131], y se ha aprovechado esta evidencia para llevar a cabo una estrategia de funcionalización que implique ciclodextrinas. En este

sentido, en esta Tesis se ha llevado a cabo la funcionalización de nanopartículas empleando como moléculas receptoras ciclodextrinas modificadas mediante métodos diseñados en este trabajo.

Las ciclodextrinas (CD) son moléculas de inclusión anfifílicas de forma toroidal, formadas por ciclos de varios anillos de glucosa (Figura 2.13). Las ciclodextrinas comerciales más empleadas son las α -, β - y γ -ciclodextrinas (formadas por 6, 7 y 8 anillos de glucosa respectivamente). Presentan un exterior hidrofílico y una cavidad interior de naturaleza hidrofóbica, por lo que son ampliamente utilizadas para solubilización de fármacos y en la industria de los detergentes. Debido a su capacidad de encapsular en su interior moléculas apolares de distintos tamaños, se consideraron buenos candidatos para actuar en la funcionalización de NPs activas frente a SDD.

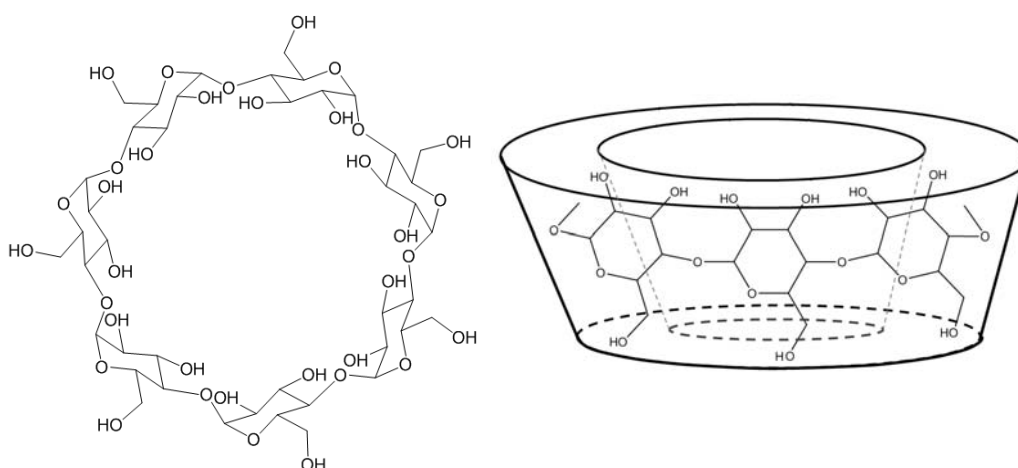


Figura 2.13. Estructura de la β -ciclodextrina

Sin embargo, ninguna de las CD mencionadas anteriormente es capaz de interactuar con superficies metálicas de Ag o Au para dar lugar a espectros SERS. Ello se debe a dos motivos fundamentales: a) la ausencia de grupos funcionales con los que esta molécula pueda anclarse sobre la superficie, y b) su elevada solubilidad en agua, que hace que las ciclodextrinas tiendan a ser solvatadas por el agua en la suspensión coloidal.

En otros trabajos pueden encontrarse algunos ejemplos de fabricación de nanosensores SERS con ciclodextrinas modificadas, concretamente mediante la síntesis de derivados tiolados o piridínicos, para favorecer su interacción con el metal ^[88, 131-135]. En esta Tesis se ha elaborado un nuevo derivado de la β -ciclodextrina capaz de actuar como ensamblador, recurriendo a la inclusión de un grupo ditiocarbamato (DTC) en su estructura.

En trabajos anteriores llevados a cabo por otros miembros de nuestro grupo se ha demostrado que el grupo DTC se une fuertemente a los coloides de plata. Los calixarenos, otro tipo de moléculas de inclusión empleadas en la funcionalización de nanopartículas en detección SERS, también pueden ser modificados con grupos DTC con el fin de aumentar su afinidad por metales dando lugar a nanosensores SERS empleados con éxito en detección de contaminantes^[72, 88].

3. OBJETIVOS

Objetivos Generales

El objetivo fundamental de esta Tesis fue la aplicación de la espectroscopía Raman intensificada por superficies metálicas plasmónicas (SERS) en la caracterización vibracional y detección molecular de sustancias de dopaje deportivo (SDD).

Este objetivo implicó una doble investigación con dos sub-objetivos: A) Desarrollo de soportes SERS de sensibilidad y selectividad avanzada basados en nanopartículas plasmónicas; y B) Aplicación efectiva de estos sistemas en el estudio de SDD.

Objetivos específicos

A) El desarrollo de soportes SERS de sensibilidad y selectividad avanzada se llevó a cabo mediante las siguientes estrategias:

A1) Fabricación de nanopartículas con diferente tamaño y morfología en la búsqueda de soportes optimizados para las aplicaciones específicas establecidas. Concretamente, se fabricaron nanoesferas y otros sistemas no convencionales como nanoprismas triangulares y nanocubos, para los que la teoría predice una mayor intensificación SERS.

A2) Ensamblaje controlado de nanopartículas. Se llevó a cabo la fabricación de espacios interpartícula de alta intensificación del campo (o *hot spots*) mediante adsorción de moléculas bifuncionales. A tal efecto, se emplearon ditiolos, diaminas y dicarboxilatos lineales con 6, 8, 10 y 12 átomos de carbono en su estructura.

A3) Funcionalización de nanopartículas. Se emplearon moléculas funcionalizadoras para modificación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de las NPs sin perjuicio de sus propiedades ópticas, con el fin de acercar el analito a la superficie metálica. Para ello se emplearon los ditioles mencionados en el punto anterior, así como un nuevo derivado de la β -ciclodextrina (6-ditiocarbamato- β -ciclodextrina) en el que se introdujo un grupo ditiocarbamato, de elevada afinidad por la superficie de metales plasmónicos como Ag y Au.

B) La aplicación efectiva de la técnica SERS para la detección de sustancias de dopaje deportivo implicó los siguientes pasos:

B1) Caracterización vibracional (IR y Raman) de las SDD clenbuterol, salbutamol, terbutalina, aminoglutetimida, probenecid y nandrolona. Dichas sustancias fueron seleccionadas en función de su diversa estructura y actividad biológica.

B2) Detección mediante SERS de SDD que se adsorben espontáneamente sobre nanopartículas.

B3) Optimización de la adsorción y espectros SERS de SDD variando diferentes condiciones experimentales como el pH, la longitud de onda de excitación y la concentración del analito; y deducción de los mecanismos de interacción con el metal y la orientación del analito sobre el metal.

B4) Seguimiento de la agregación inducida por las SDD mediante la resonancia de plasmón superficial en espectros de extinción y posibilidades analíticas de este estudio en detección de SDD.

B5) Detección de SDD que no se adsorben directamente mediante ensamblaje a través de 6-ditiocarbamato- β -ciclodextrina.

B6) Investigación de la adsorción de los SDD sobre los sistemas fabricados en el apartado (A), lo que implicó: a) la obtención de las isothermas de adsorción, y b) la deducción de los parámetros de la adsorción (constante de adsorción y límite de detección).

B7) Evaluación comparativa de la potencialidad de la técnica SERS en la detección de SDD.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiales.....	40
4.2. Instrumentación.....	41
4.3. Métodos.....	43
4.3.1. Preparación de nanopartículas metálicas.....	43
4.3.2. Síntesis del ácido 6-ditiocarbámico- β -ciclodextrina y funcionalización de nanopartículas de Ag.....	45
4.3.3. Preparación de muestras y registro de medidas.....	47
4.3.4. Cálculos mecanocuánticos.....	49

4.1. Materiales

El nitrato de plata, clorhidrato úrico trihidratado (99,5%), citrato trisódico, nitrato potásico (99%), bromuro potásico (99,5%), cloruro sódico (99,5%), borohidruro sódico (96%) y ácido ascórbico (99,7%) fueron comprados a Merck.

El hidróxido sódico (99,998%) se adquirió de Sigma-Aldrich. La R(+)-aminoglutetimida (97%) y el clorhidrato de hidroxilamina (99%) se adquirieron de Aldrich. El clorhidrato de clenbuterol (95%), salbutamol (100%), hemisulfato de terbutalina (100%) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, 98%) se adquirieron de Sigma. El aldrín se obtuvo de Riedel-de-Haën con una pureza superior al 99%. Se prepararon disoluciones acuosas de clenbuterol y CTAB 0.1 M; el resto de las sustancias se disolvieron en etanol a la misma concentración.

El 1,6-hexanoditiol (DT6), 1,6-diaminohexano (DA6), 1,8-diaminooctano (DA8), 1,10-diaminodecano (DA10), 1,12-diaminododecano (DA12), ácido adípico (DC6), ácido subérico (DC8), ácido sebácico (DC10) y ácido 1,12-dodecanodioico (DC12) se adquirieron de Sigma Aldrich con pureza de >98% w/w. El 1,8-octanoditiol y el 1,10-decanoditiol (DT10) se adquirieron de Alfa Aesar con pureza del 98% y 95%, respectivamente. Se prepararon disoluciones etanólicas de estas sustancias con una concentración final de 0.1 M, que fueron posteriormente diluidas según necesidad.

Las disoluciones acuosas se prepararon empleando agua MilliQ obtenida con un sistema de purificación de agua Integral 3 de Millipore. El etanol empleado, así como la dimetilformamida, sulfuro de carbono y trietilamina, son de grado analítico y fueron adquiridos de Merck.

Los derivados sulfonato, metilcarboxilato y 6-monoamino de la β -ciclodextrina se adquirieron de Sigma Aldrich.

4.2 Instrumentación

Los espectros SERS se registraron empleando un Raman Renishaw RM2000 (Figura 4.1, izquierda) equipado con tres líneas de excitación proporcionadas por los siguientes láseres: a) láser de diodo con emisión a 785 nm, b) láser de He/Ne a 632.8 nm y c) láser de Ar⁺ a 514.5 nm. El sistema estaba dotado de un dispositivo macro que permite enfocar el láser directamente en el interior de una cubeta (Figura 4.1, derecha), y una cámara CCD con refrigeración eléctrica. La señal fue registrada con una geometría de 180°. También se utilizó un instrumento Renishaw InVia con el mismo sistema de detección, equipado con líneas de excitación a 785 nm y 532 nm, proporcionadas por un láser de diodo y un láser de Nd-YAG, que emite a 1064 nm y cuya longitud de onda se cambia a 532 nm mediante un doblador de frecuencia.



Figura 4.1. Izquierda: Espectrofotómetro Raman Renishaw RM 200. Derecha: Dispositivo macro enfocando el láser en el interior de una cubeta de cuarzo.

Los espectros Raman de los compuestos puros fueron registrados en un espectrómetro FT-Raman Bruker, modelo RFS 100/S equipado con un láser Nd-Yag de 1064 nm con un detector de Ge refrigerado con nitrógeno líquido.

Los espectros de absorción infrarroja se registraron en un instrumento Bruker IFS66 equipado con un detector DTGS, operando a temperatura ambiente.

Los espectros de extinción de los coloides para medida de la resonancia de plasmones se registraron en dos instrumentos diferentes: a) espectrofotómetro UV-visible de haz sencillo Thermo Spectronic Helios λ , equipado con una lámpara de deuterio y una de wolframio y un detector de fotiodo; y b) espectrofotómetro UV-visible-NIR de doble haz Shimadzu 3600, con las mismas fuentes de excitación

equipado con tres detectores: un PMT para la región UV-visible y detectores InGaAs y PbS para la región del infrarrojo cercano (NIR).

Las micrografías TEM fueron obtenidas mediante un microscopio JEOL JEM 2000FX con un voltaje de aceleración de 200 kV situado en el Servicio de Microscopía de la Universidad Complutense de Madrid, o bien con un JEOL JEM-2010, también a 200 kV, del Instituto de Estructura de la Materia del CSIC. Las micrografías SEM de nanocubos y nanovarillas de Au se obtuvieron con un microscopio FEI XL30 ESEM-TMP en el Laboratorio de Fisicoquímica de Superficies Sólidas de la Universidad de Xiamen (China).

El instrumento de espectroscopía de modulación espacial utilizado en esta Tesis fue diseñado y construido por el grupo de investigación del Laboratorio de Espectrometría Iónica y Molecular (LASIM), de la Universidad Claude Bernard Lyon I. Así pues, estas medidas fueron realizadas en dicho laboratorio. Este equipo consta de una lámpara blanca de filamento con una temperatura de color de 3200K, una plataforma de barrido nanométrico multieje donde se encuentra el compartimento de la muestra en configuración confocal, un espectrofotómetro Jobin-Yvon TRIAX 190 y un amplificador lock-in (Standford Research 830), además de una cámara CCD retráctil que permite situar la muestra en la posición de interés y enfocar.

Los cálculos de los espectros vibracionales de las moléculas se realizaron empleando el programa Gaussian 03^[132], incluido en el cluster Trueno del CSIC.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparación de nanopartículas metálicas

Nanopartículas esféricas de plata

Los coloides integrados por NPs esféricas de Ag se fabricaron mediante tres procedimientos distintos empleando como reductores citrato (AgCT), hidroxilamina (AgHX) y borohidruro (AgBH):

A) Reducción con hidroxilamina mediante uno de los métodos descritos por Leopold y Lendl^[133], con algunas modificaciones: a 90 mL de una disolución de clorhidrato de hidroxilamina $1,66 \cdot 10^{-3}$ M, se adicionaron 300 μ L de NaOH 1M bajo agitación vigorosa. A esta disolución se adicionaron gota a gota 10 mL de disolución de nitrato de plata 10^{-2} M. Al acabar la adición, se paró la agitación. Con este método se obtuvieron nanopartículas esféricas con un diámetro medio de 40 nm.

B) Reducción con citrato, usando el procedimiento descrito por Lee y Meisel^[55]: 50 mL de AgNO_3 10^{-3} M se llevaron hasta ebullición, y a continuación se adicionó 1 mL de una disolución de citrato trisódico al 1%. La reacción se mantuvo a reflujo durante 1h. Este método dio lugar a nanopartículas esféricas con un diámetro medio de 60 nm.

C) Reducción con borohidruro, empleando el procedimiento de Creighton y Blatchford^[5]. Para esta síntesis, se introdujeron 30 mL de una disolución de NaBH_4 de concentración $2 \cdot 10^{-3}$ M en un matraz erlenmeyer en baño de agua-hielo. A continuación, manteniendo agitación fuerte, se adicionaron lentamente 10 mL de una disolución de AgNO_3 10^{-3} M. La disolución se tornó inmediatamente de color amarillo transparente, y se dejó alcanzar temperatura ambiente lentamente para evitar la precipitación de las nanopartículas, que se obtuvieron con un diámetro promedio de 10 nm.

Nanoprismas triangulares de plata

Los coloides de nanoprismas triangulares (AgNPT) se prepararon mediante una modificación del procedimiento descrito por Cathcart, Frank y Kitaev^[134]: se prepararon 40 mL de una disolución acuosa que contiene $2,4 \cdot 10^{-3}$ M de citrato sódico, $1,2 \cdot 10^{-3}$ M AgNO_3 , $2,6 \cdot 10^{-2}$ M H_2O_2 y $6,5 \cdot 10^{-7}$ M KBr en un matraz Erlenmeyer. A

continuación la disolución anterior se enfrió durante media hora a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se adicionan bajo agitación fuerte 480 µL de una disolución de NaBH₄ 0.1 M recién preparada. La disolución adquirió de manera inmediata un color amarillo pálido, indicando la formación de semillas de plata. Dicha disolución se dejó reposar a temperatura ambiente. Al cabo de 3-4 minutos se comenzó a observar un rápido cambio en el color desde amarillo hasta azul violáceo, transición ésta que se produce durante los 5 min posteriores. Estos cambios en el color se producen como consecuencia del crecimiento de las nanopartículas y formación de los nanoprismas.

Nanopartículas esféricas de oro

Las NPs esféricas de Au (AuCT) se prepararon según el procedimiento descrito por Frens ^[135]: 0,1 mL de una disolución acuosa de HAuCl₄ 0,118 M se diluyeron en 40 mL de agua, bajo intensa agitación. A continuación, a esta disolución se adicionó 1 mL de disolución de citrato trisódico al 1% gota a gota. La mezcla se llevó a ebullición, y se mantuvo durante 5 minutos, tiempo éste en el que se observó un cambio de color de la disolución de amarillo a azul, morado, y por último, rojo. Este método da lugar a partículas esféricas con un diámetro medio de 15 nm.

Nanocubos y nanocuboctaedros de oro

Los coloides de nanocubos (AuNC) y nanocuboctaedros (AuNCO) se prepararon empleando un procedimiento de crecimiento de semillas dirigido por un tensioactivo ^[136]. Dicho procedimiento tiene lugar en tres etapas:

1. Síntesis de las semillas: Sobre 7.5 mL de una disolución acuosa 0.1 M de CTAB se adicionaron 250 µL de HAuCl₄ 0.01M, llevándose a continuación hasta un volumen total de 10 mL en agua. El matraz con la mezcla se introdujo en un baño de agua a 30° C y se inició una agitación intensa. Se adicionaron a continuación 600 µL de una disolución de NaBH₄ 0.1 M recién preparada. El color de la disolución cambió inmediatamente de amarillo a marrón oscuro. Posteriormente, la suspensión se dejó reposar durante una o dos horas para que se completara la reacción. Por último, 100 µL de esta suspensión se diluyeron en 10 mL de agua.
2. Facetado de los cristales: En un tubo de ensayo de 50 mL de capacidad, se adicionaron 4 mL de CTAB 0.1 M y 100 µL de HAuCl₄ 0.01M, enrasando posteriormente con agua hasta 25 mL. A continuación, se adicionaron 1.5 mL de

ácido ascórbico 0.1 M, y se agitaron suavemente, observándose un cambio de color en la disolución, que pasa de amarillo pálido a totalmente incolora. Sobre esta disolución se añadieron entonces volúmenes variables de la disolución de semillas preparada anteriormente, agitando a alta velocidad en un mezclador TAX. La forma final de los cristales queda determinada por la cantidad de semillas que se adicionan en esta etapa. La adición de 100 μL de semillas diluidas dio lugar a la formación de nanocubos bien definidos, mientras que con 300 μL se formaron nanocubos facetados o cuboctaedros. Para que el facetado se completara, la mezcla se dejó reposar durante 3h en un baño de agua a 30 °C. Las suspensiones, formadas principalmente por octaedros de oro de pequeño tamaño, adquieren una tonalidad rosada.

3. Crecimiento: Finalmente se adicionó 1 mL de HAuCl_4 0.01M a la suspensión coloidal anterior con ayuda de un mezclador TAX para completar el crecimiento de las NPs. La reacción de crecimiento transcurrió durante dos horas manteniendo la suspensión a 30 °C y en reposo.

4.3.2 Síntesis del ácido 6-ditiocarbámico- β -ciclodextrina y funcionalización de nanopartículas de Ag

En un primer intento de modificar la estructura de CD e incluir un grupo químico que aumentase su afinidad por el metal, se emplearon los derivados comerciales sulfonato, 6-monoamino y metilcarboxilato de la β -ciclodextrina. Sin embargo, estos derivados también demostraron ser incapaces de inmovilizarse sobre las NPs. Se realizaron pruebas utilizando coloides de oro y plata como sustrato, a diferentes longitudes de onda de excitación y valores de pH, y no se obtuvo en ningún caso ningún espectro SERS a pesar de que el grupo amino y carboxílico pueden llegar a manifestar algún tipo de afinidad por Ag o Au.

Fue necesario, por consiguiente, sintetizar un derivado de la ciclodextrina que incluyera un grupo funcional de elevada afinidad por los metales. Como se adelantó en la sección de Antecedentes, se optó por la inclusión de un grupo ditiocarbámico (DTCH).

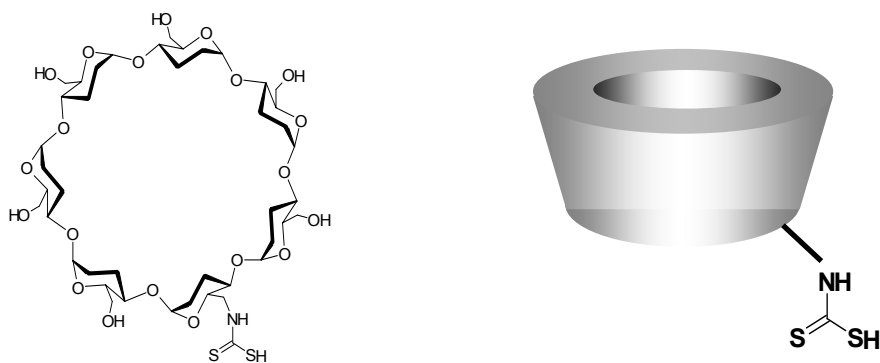
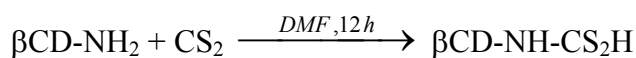


Figura 4.2. Estructura del derivado ditiocarbámico de β -ciclodextrina

La inclusión de un grupo DTCH en la ciclodextrina se llevó a cabo a partir del derivado 6-monoamino de β -CD (β CD-NH₂), modificando el método descrito en la bibliografía para este tipo de reacciones^[89, 137] para obtener el correspondiente ácido ditiocarbámico de β -ciclodextrina (DTCDH, Figura 4.2).

Para llevar a cabo esta modificación, en un matraz redondo de 25 mL se disolvieron 50 mg de β CD-NH₂ en 1.3 mL de dimetilformamida, y se adicionaron 20 μ L de trietilamina. Seguidamente, se adicionan rápidamente 30 μ L de una disolución de CS₂ en DMF al 10% en volumen, bajo atmósfera inerte, a temperatura ambiente y con agitación. Esta agitación se mantuvo durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, el producto precipitó adicionando 2.4 mL de THF. El sólido obtenido se lavó dos veces con éter dietílico en baño de ultrasonidos durante 5 minutos, y por último se secó en estufa a 50 °C durante media hora. La reacción de adición de CS₂ puede formularse de la siguiente manera:



Los ácidos ditiocarbámicos son, por regla general, compuestos metaestables que descomponen con el tiempo, revertiendo a la forma amina primaria. Por este motivo, consideramos que no sería posible retirar por completo los restos de DMF del producto de reacción sin dañar al mismo.

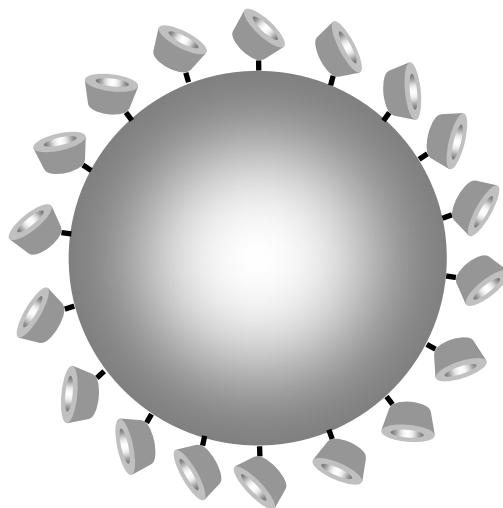


Figura 4.3. Representación de una nanopartícula recubierta de DTCDH

Para proceder a la funcionalización de las nanopartículas metálicas con DTCDH (Figura 4.3), se llevó a cabo un estudio de la optimización de dicha inmovilización. Se prepararon disoluciones de DTCDH en DMF a distintas concentraciones: $10^{-1}/10^{-2}/10^{-3}/10^{-4}$ M. Un volumen final de 1 μL de las anteriores disoluciones fue añadido a un volumen de 1 mL de la suspensión de nanopartículas de Ag hasta alcanzar concentraciones finales de DTCDH comprendidas entre 10^{-5} y 5×10^{-3} M.

4.3.3 Preparación de muestras y registro de medidas

Los espectros de IR de los compuestos puros se realizaron dispersando los sólidos en pastillas de KBr.

La preparación de las muestras para SERS y UV-visible se realizó añadiendo a 1 mL de coloide, entre 40 y 60 μL de una disolución acuosa de NaCl 0.5 M ó KNO_3 a una concentración de 0.5 M, con el fin de inducir la agregación de las NPs. A continuación se adicionó la disolución del analito hasta la concentración deseada. Las moléculas funcionalizadoras fueron adicionadas al coloide directamente desde disolución inmediatamente antes de la adición del analito.

Las muestras observadas mediante microscopía electrónica de transmisión se prepararon depositando una alícuota (aproximadamente 10 μL) de coloide sobre una rejilla de cobre CF400 recubierta con una capa fina (30-50 nm) de carbono puro. Para la observación por SEM, se secaron a vacío 10 μL de muestra sobre un monocristal de

silicio. De esta forma, se pudieron realizar micrografías a altas magnificaciones que muestran varias partículas.

La espectroscopía con modulación espacial (SMS) es una técnica que mide la extinción UV-visible de la muestra en geometría de 180° , como en un espectrofotómetro UV-visible común, pero con mayor sensibilidad y con una resolución espacial del orden de una micra. La preparación de las muestras se realizó depositando el coloide diluido (1:5 en volumen) sobre una rejilla de Formvar de casillas numeradas, mediante *spin coating*. Este procedimiento permitió que las partículas se encontraran lo suficientemente separadas para no interferir entre sí en la toma de espectros en SMS, además de facilitar la correlación de los espectros registrados con la observación de la muestra en TEM.

El registro de los espectros SMS requiere de un conocimiento previo del espectro de la muestra analizada a nivel macroscópico, o bien de un cálculo teórico de las bandas de resonancia de plasmón del sistema. Una vez situada la muestra en la plataforma oscilante, se seleccionó la casilla a estudiar mediante la cámara CCD y llevando a foco. A continuación se realizó un barrido rápido de lectura de intensidad a una longitud de onda apropiada. De esta forma, se observó el aspecto general de la misma a esta longitud de onda, pudiéndose entonces anotar las coordenadas internas de las cuatro esquinas en el equipo. Se seleccionó una sección en la que no se observe mucha intensidad y se procedió a obtener un barrido lento, con mayor tiempo de acumulación de cada medida, y a varias longitudes de onda si era necesario (Figura 4.4).

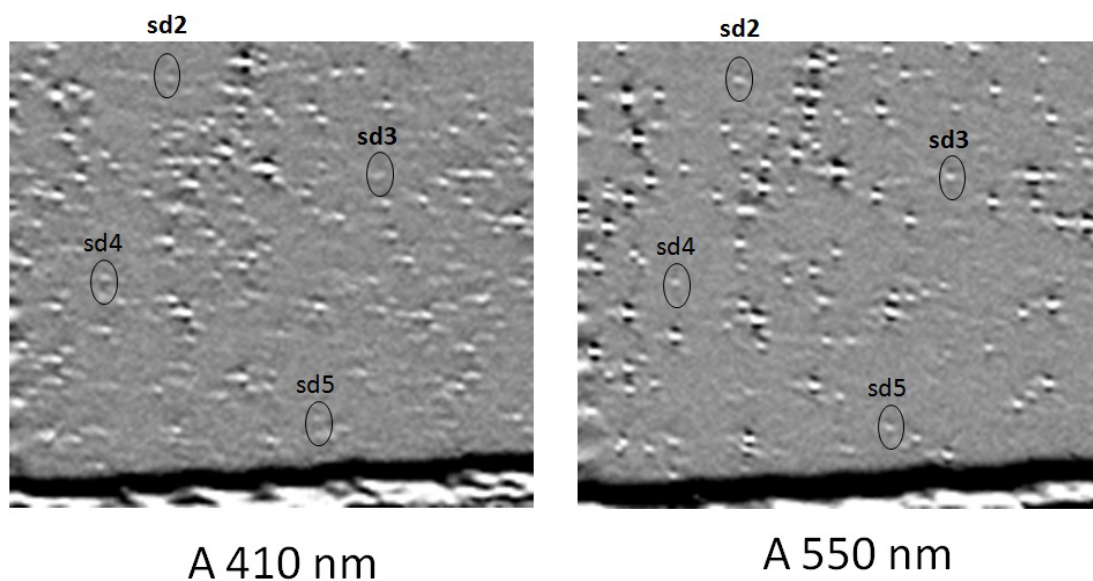


Figura 4.4. Mapa SMS a dos λ de una muestra de nanopartículas esféricas de Ag agregadas con un ensamblador bifuncional.

Por último, en función de las necesidades del experimento, se seleccionaron aquellos puntos que presentaron un mayor interés, determinándose su situación en coordenadas internas y se tomó un espectro de los mismos. Mediante esta técnica puede interponerse un polarizador entre el compartimento de muestra y el detector para registrar exclusivamente la luz polarizada a un ángulo determinado, lo que da lugar a una variación de intensidad dependiendo de la morfología del objeto estudiado.

La correlación de la espectroscopía SMS con microscopía TEM se realizó situando la muestra en un microscopio, observando la misma casilla y trasladando las coordenadas internas del SMS a las coordenadas internas del TEM para localizar los puntos estudiados (Figura 4.5). Asimismo, deben encontrarse patrones identificables en ambas imágenes, teniendo en cuenta que los objetos que se observan en el mapa de SMS parecen mayores de lo que son en realidad, debido a las limitaciones de la técnica en resolución espacial: para considerarse que la señal obtenida pertenece a un solo objeto, no debe encontrarse ningún otro en un radio de una micra.

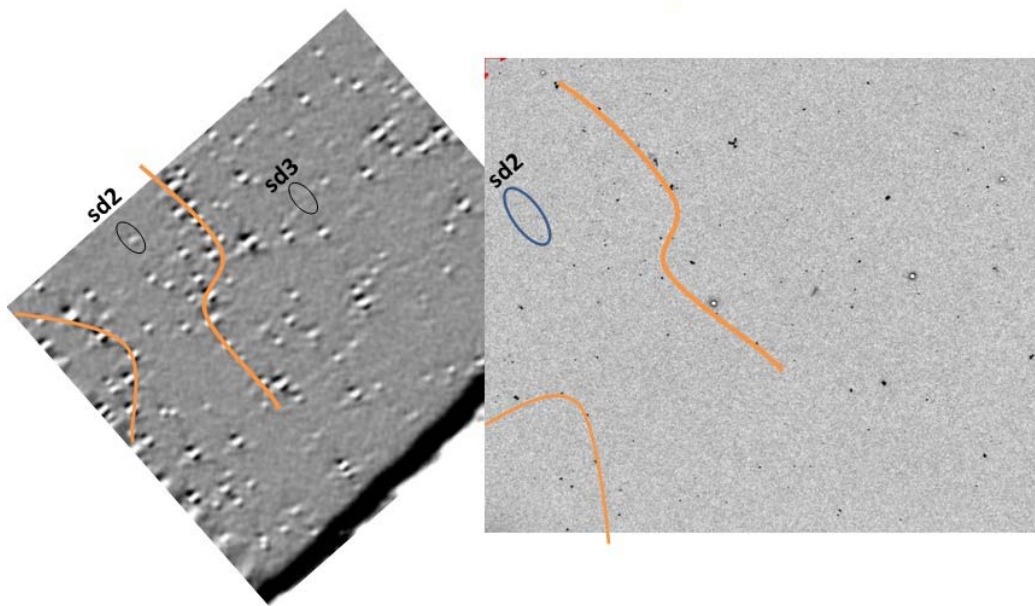


Figura 4.5. Correlación de un mapa SMS con una micrografía TEM, con mayor resolución espacial.

4.3.4 Cálculos mecanocuánticos

Se utilizó el programa Gaussian 03 para el cálculo teórico de los espectros IR y Raman de las moléculas estudiadas. Se empleó el funcional B3LYP^[138], basado en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)^[139, 140], para los distintos sistemas

moleculares. En todos los casos se realizó inicialmente una optimización de geometría utilizando la aproximación de Hartree-Fock, que se refinó a continuación utilizando el funcional B3LYP en condiciones de convergencia estrictas. Los conjuntos de base escogidos^[141, 142] fueron seleccionados para cada molécula en función de su estructura.

Así, se emplearon los siguientes:

- i) 6-311G con una función de polarización *d* para el clembuterol
- ii) 6-311G para el salbutamol
- iii) 6-311+G para la aminoglutetimida
- iv) 6-311+G, con el potencial nuclear efectivo LanL2DZ para el átomo de azufre, en el caso del probenecid.
- v) 6-311G para la nandrolona.

Para la obtención de los espectros IR y Raman se calcularon las frecuencias vibracionales armónicas de las geometrías optimizadas en el vacío.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Nanofabricación y ensamblaje de nanopartículas con propiedades plasmónicas.....	52
5.1.1. Caracterización de las diferentes nanoestructuras metálicas fabricadas.....	53
5.1.2. Ensamblaje de nanopartículas plasmónicas mediante sistemas moleculares bifuncionales y formación de hot spots de tamaño controlado.....	60
5.2. Funcionalización de nanopartículas.....	70
5.2.1. Funcionalización con moléculas bifuncionales.....	71
5.2.2. Funcionalización con β -ciclodextrina derivatizada con un grupo ditiocarbamato.....	76
5.3. Detección de sustancias de dopaje deportivo mediante resonancia de plasmón.....	82
5.3.1. Medida del pKa de la aminoglutetimida sobre nanopartículas de plata.....	82
5.3.2. Detección de sustancias de dopaje deportivo por resonancia de plasmón en nanopartículas de oro.....	84
5.4. Detección mediante SERS: Aspectos cualitativos.....	88
5.4.1. Espectros de vibración de SDD.....	89
5.4.2. SERS de SDD que interaccionan directamente con el metal.....	97
5.4.3. Detección de analitos mediante la funcionalización de la superficie metálica.....	118
5.5. Análisis cuantitativo de SDD mediante SERS.....	125
5.4.4. Isotermas de adsorción.....	125
5.4.5. Detección cuantitativa de SDD mediante SERS.....	134
5.6. Results outline and comparative evaluation.....	142

5.1. Nanofabricación y ensamblaje de nanopartículas con propiedades plasmónicas

El desarrollo de nuevas superficies plasmónicas es un tema de interés en diversas áreas, desde su aplicación como sensores y marcadores hasta estudios fundamentales de dispersión de luz por nanoestructuras [60, 134, 143-155]. Debido a que el efecto SERS se debe a la excitación de los plasmones de superficie localizados, es importante conocer las características ópticas de las nanoestructuras empleadas como sustrato en un experimento SERS, así como la caracterización de las propiedades superficiales de estas nanopartículas que determinan la adsorción de la molécula a estudiar. En el desarrollo de esta Tesis se han empleado NPs de diferente morfología sintetizadas usando métodos ya publicados anteriormente, convenientemente modificados, así como métodos novedosos aplicados en este trabajo con el fin de mejorar las propiedades plasmónicas y superficiales de los soportes empleados. En particular, se ha estudiado su potencial como sustratos SERS alternativos a las NPs más comúnmente empleadas hasta la fecha.

Por otro lado, la fabricación de nanohuecos de tamaño controlado entre superficies plasmónicas también ha sido objeto de numerosos estudios tanto teóricos como experimentales [11, 13, 15, 26, 31, 156-159]. Las predicciones teóricas indican que el campo electromagnético existente en dichos huecos sufre una intensificación inmensa, razón por la cual son, como hemos dicho, conocidos como *hot spots* (HS). Una de las aplicaciones más prometedoras de estos nanohuecos se refiere a su uso en espectroscopía SERS, ya que las NPs metálicas esféricas aisladas no presentan una intensificación notable del campo cercano al ser excitadas a la frecuencia de resonancia. No obstante, se puede obtener una señal mucho mayor al agregar las NPs para formar HS. De este modo, el ensamblaje de las nanopartículas resulta esencial para obtener un espectro SERS. Una vez ensambladas, las nanopartículas metálicas presentan los mayores factores de intensificación conocidos de entre todos los posibles sustratos SERS, y son generalmente escogidas para los experimentos de detección de moléculas aisladas [8, 9, 69].

En este contexto, uno de los retos actuales de la espectroscopía SERS con NPs es la fabricación de HS de tamaño y naturaleza controlados mediante un ensamblaje dirigido. En este trabajo se han empleado moléculas lineales α,ω -bifuncionales capaces de actuar como ensambladoras de NPs para inducir una agregación controlada de éstas y la formación consiguiente de nanohuecos de tamaño controlado.

5.1.1. Caracterización de las diferentes nanoestructuras metálicas fabricadas

Las NPs preparadas para ser empleadas como substratos SERS se pueden caracterizar mediante el espectro de extinción de los plasmones de superficie localizados de las suspensiones coloidales; para ello se ha usado la espectrofotometría ultravioleta-visible. Asimismo, la morfología de estas NPs se ha caracterizado mediante microscopía electrónica. En general, para nanoestructuras dentro del intervalo de tamaños estudiado, las microscopías electrónicas de transmisión (TEM) y barrido (SEM) son las más adecuadas.

A. Caracterización de coloides metálicos de nanopartículas esféricas

El procedimiento de reducción de una sal de oro o plata utilizando como reductor el citrato trisódico, da lugar a nanopartículas esféricas de diferentes tamaños promedio (8 y 50 nm, respectivamente, Figura 5.1 derecha) debido a los diferentes potenciales de reducción y a diferencias en la energía de superficie de ambos metales.

Asimismo, debido a sus diferentes constantes dieléctricas, el espectro de extinción de los plasmones de superficie varía considerablemente de uno a otro coloide.

Al tratarse de NPs aproximadamente esféricas, los dos espectros presentan un sólo máximo de resonancia correspondiente a la vibración dipolar (Figura 5.1, izquierda). Como hemos explicado en la sección 2.2, según la Teoría de Mie ^[160], la posición del máximo de extinción del LSP depende del tamaño de las NPs (cuanto más pequeñas, la resonancia ocurre más hacia el azul) para un metal dado, mientras que la anchura a media altura proporciona una medida relativa de la polidispersidad de tamaños, que es muy superior en el caso del coloide de plata que en el de oro.

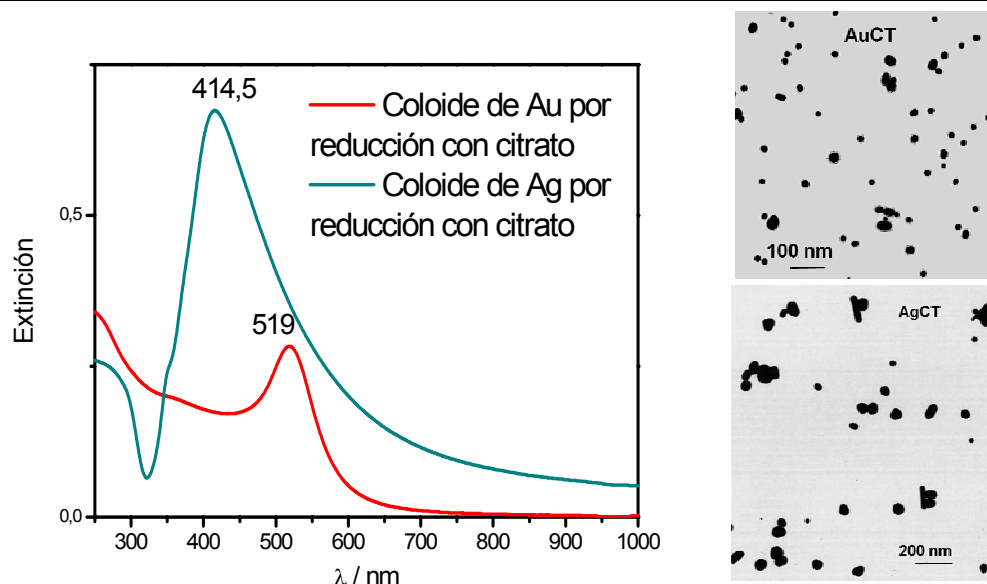


Figura 5.1. Espectro UV-visible e imágenes SEM de coloides de oro y plata reducidos con citrato (CT).

Por otro lado, la obtención de NPs de plata mediante reducción con hidroxilamina permite la obtención de partículas más pequeñas y menos polidispersas (Figura 5.2). En el procedimiento descrito por Leopold y Lendl, la reducción del ión Ag^+ por parte de la hidroxilamina se realiza en medio básico ($\text{pH}=9$).

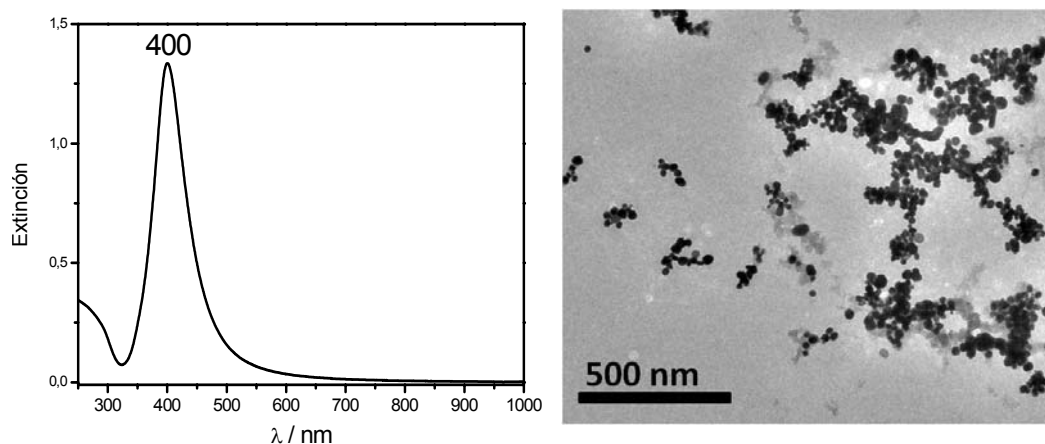


Figura 5.2. Espectro UV-visible e imagen TEM de un coloide de plata obtenido por reducción con hidroxilamina (AgHX).

En el caso del coloide AgHX, el máximo de extinción aparece a longitudes de onda menores (como corresponde a un menor tamaño), y la anchura de la banda es inferior a la del espectro del coloide de plata-citrato (Figura 5.2). En la imagen de microscopía se observa que el coloide de hidroxilamina está formado por nanopartículas esféricas con un diámetro medio de 38 ± 5 nm.

B. Caracterización de coloides de nanoprismas triangulares de plata

La observación por microscopía electrónica del coloide AgNPT, preparado por el método de Cathcart y col.^[134] confirmó que está formado principalmente por nanoprismas triangulares de plata de 36 ± 2 nm de lado y 6.6 ± 0.8 nm de espesor (Figura 5.3. derecha). Los vértices de los triángulos son levemente redondeados. La suspensión está también integrada en un 6% por prismas hexagonales. Los nanoprismas formados tienden a formar agregados por apilamiento sobre las caras triangulares

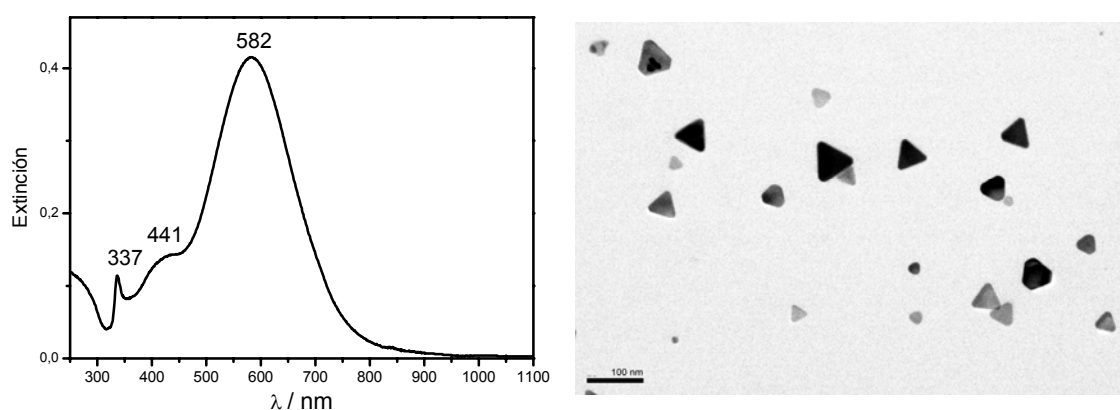


Figura 5.3. Espectro UV-visible e imagen TEM del coloide de nanoprismas triangulares de plata (AgNPT).

El espectro de extinción del coloide AgNPT (Figura 5.3 izquierda) presenta tres bandas: la primera, a 339 nm, se debe a la resonancia del modo fuera del plano de los plasmones de superficie localizados; la segunda, a 440 nm, se debe a los modos cuadrupolares de vibración de los LSP en el plano; mientras que la más intensa, cuya longitud de onda es más dependiente del tamaño de los triángulos, es debida a vibraciones dipolares en el plano.

En esta Tesis se ha llevado a cabo una aplicación de los coloides AgNPT al estudio SERS de SDD, con el fin de aumentar la intensidad SERS obtenida en relación a las NPs esféricas convencionales estudiadas anteriormente.

C. Caracterización de nanocubos y nanocuboctaedros de oro

La morfología de las NPs existentes en coloides AuNC y AuNCO depende de la cantidad de semillas de partida (sección 4.3.1.), ya que determinan que las nanopartículas resultantes presenten vértices más o menos facetados. Esto se debe a que, al aumentar la cantidad de semillas en la suspensión, el crecimiento de las mismas es

más homogéneo alrededor de las mismas. Un coloide de cubos con vértices muy facetados puede considerarse como una suspensión de cuboctaedros de oro (Figura 5.4, derecha).

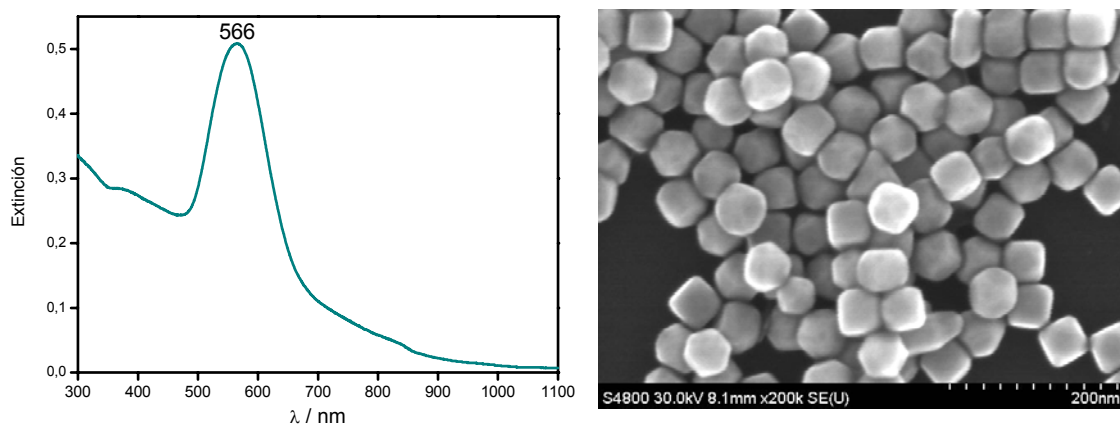


Figura 5.4. Espectro UV-visible e imagen SEM de nanocuboctaedros de oro

En este caso de los cuboctaedros, se observa que su espectro de extinción UV-visible presenta un perfil similar al de las partículas esféricas, ya que la simetría del cuboctaedro es más parecida a la de una esfera (Figura 5.11, izquierda). Estas nanopartículas presentan un diámetro promedio de 65 nm, lo que da lugar a una resonancia de plasmón que aparece a una longitud de onda de 566 nm, superior a la del coloide de AuCT debido a su mayor tamaño.

En condiciones experimentales que favorecen la formación de cubos, se obtiene un coloide formado principalmente por estas estructuras, con 67 ± 2 nm de lado y vértices redondeados (Figura 5.5, izquierda).

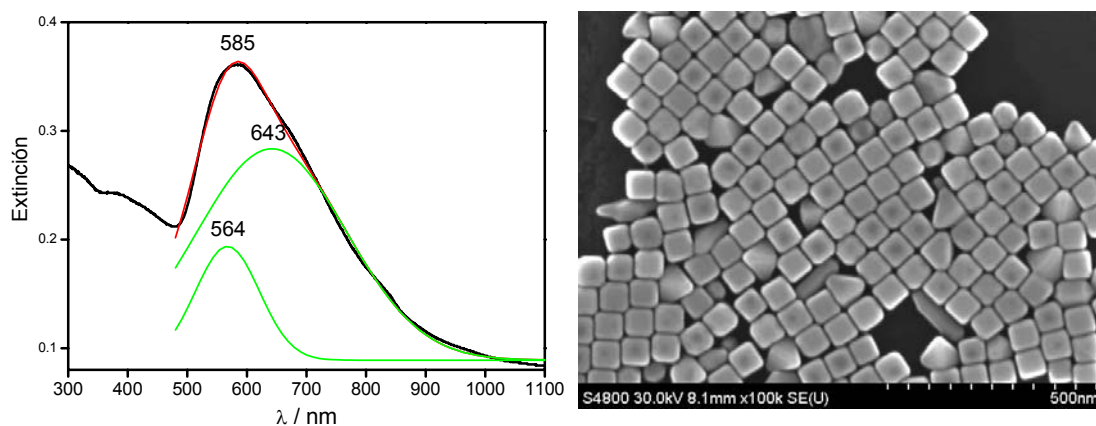


Figura 5.5. Espectro UV-visible e imagen SEM de nanocubos de oro

El espectro de extinción de este coloide está formado por una banda ancha con máximo a 585 nm, la cual está integrada por dos resonancias de plasmón: una a 564 nm, que indica la presencia de nanocuboctaedros, y una segunda a 643 nm, debida a la resonancia de los nanocubos (Figura 5.5, derecha). El análisis de la morfología por microscopía electrónica confirma esta interpretación, puesto que se observa una pequeña proporción de nanopartículas crecidas en otras formas características de la red cristalina del Au (cúbica centrada en las caras) como tetraedros y cuboctaedros.

D. Estudio del factor de intensificación (EF)

Con el objetivo de evaluar comparativamente la eficacia SERS de los coloides anteriormente descritos, se realizó un estudio de intensificación de la señal Raman empleando como molécula patrón el tiofenol (TP). Esta molécula se une a las nanopartículas metálicas mediante la formación de enlaces covalentes, por lo que además de la intensificación por acción del campo electromagnético se produce una intensificación por mecanismo químico. Sin embargo, se trata de una molécula no resonante (no absorbe en la región del visible), por lo que la intensificación no se ve alterada por procesos de resonancia Raman.

El cálculo del factor de intensificación (EF) se realizó por comparación de la intensidad Raman en las mismas condiciones de medida del compuesto en disolución o en estado líquido (puro) y en presencia de nanopartículas, a través de la fórmula:

$$EF = \frac{I_{SERS} \cdot C_{DIS}}{C_{SERS} \cdot I_{DIS}} \quad (2)$$

Mencionada en el capítulo de Antecedentes, donde I es la intensidad de una determinada banda en los espectros Raman y SERS, y C es la concentración de TP, ya sea en el experimento SERS o en disolución.

El EF de los coloides de Ag se calculó a partir de la intensidad de la banda a 1583 cm^{-1} (Figura 5.6), correspondiente a la vibración 8a del anillo aromático de TP, al ser la banda que sufrió mayor intensificación. Dicho EF es de $1.3 \cdot 10^7$ para el coloide de AgNPT, dos órdenes de magnitud superior al que puede obtenerse para la misma molécula y línea de excitación en el caso del coloide de Ag por reducción con citrato: $3.5 \cdot 10^5$. Este resultado indica que el coloide AgNPT presenta una mayor actividad SERS que los correspondientes coloides de NPs esféricas (Figura 5.6).

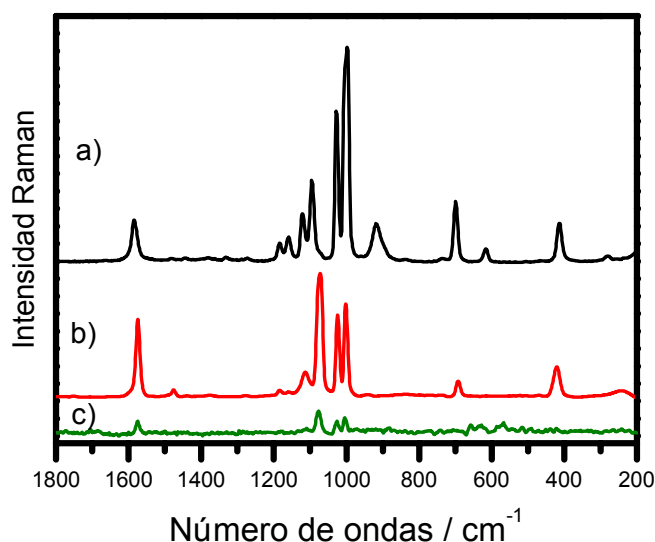


Figura 5.6. a) Espectro Raman de TP puro, b) SERS de TP 10^{-6} M en AgNPT, c) SERS de TP 10^{-6} M en AgCT (intensidad multiplicada 10 veces). $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm.

Las suspensiones coloidales de nanocubos (AuNC) o nanocuboctaedros (AuNCO) de oro no han sido empleados hasta la fecha como sustratos para la obtención de espectros SERS promediados. Esto es debido a que en el método de obtención de nanopartículas cúbicas de Au, se utiliza como surfactante y agente de terminación el CTAB. Este compuesto se adiciona a la mezcla en exceso, y se adsorbe fuertemente sobre las nanopartículas en determinadas caras cristalinas para favorecer el crecimiento facetado. Por lo tanto, la misma característica que hace al CTAB un buen agente de terminación, limita seriamente la adsorción de analitos que puedan ser estudiados por SERS. Por otro lado, el CTAB también actúa como estabilizador del coloide, por lo que su completa eliminación una vez acabada la síntesis provoca la precipitación de las nanopartículas de oro.

Parte del CTAB adsorbido sobre las nanopartículas pudo ser eliminada mediante una serie de ciclos de centrifugación-resuspensión, en cada uno de los cuales se redujo la concentración de este tensioactivo en un 80%. Las suspensiones resultantes permitieron obtener espectros SERS de estos sustratos en presencia de tiofenol después de cada ciclo, utilizando la línea de excitación a 785 nm. De esta manera, se observa que la solución de compromiso para la observación de efecto SERS con estos coloides sin perjudicar la estabilidad del coloide se alcanza con una concentración de CTAB $2.5 \cdot 10^{-5}$ M (Figura 5.7).

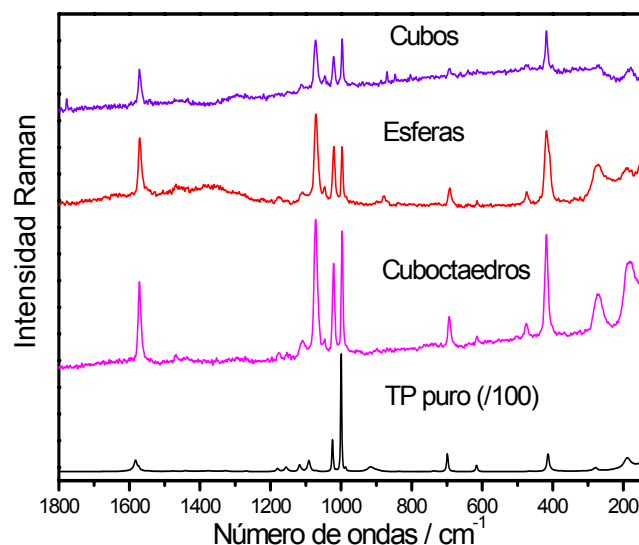


Figura 5.7. Espectros SERS del tiofenol en diversos coloides (10^{-6} M) y Raman del tiofenol puro.

Los EF fueron en este caso calculados para la banda a 996 cm^{-1} del TP, por ser la más intensificada en el espectro SERS sobre Au. La Tabla 5.1 recoge los valores de EF de nanocuboctaedros, nanocubos y nanoesferas de Au. La intensificación obtenida con coloides AuNC y AuNCO es del mismo orden de magnitud que la que presenta el coloide AuCT. Es decir, la mejora en intensificación que pudiera obtenerse mediante la existencia de vértices en estas NPs está compensada por la interfase de las NPs, que al presentar una gran cantidad de CTAB impide la adsorción del analito. Asimismo, estos coloides presentan una actividad muy reducida en el caso de SDD, lo que se atribuye a la menor afinidad de estos compuestos por la superficie de Ag en comparación con el TP. Por lo tanto, el uso de estas NPs en la detección de SDD está muy limitado.

Tabla 5.1. Factores de intensificación para el tiofenol con coloides de Au de diferente morfología

Nanoestructura	Intensificación (EF)
AuNC	$3.0 \cdot 10^5$
AuNCO	$6.8 \cdot 10^5$
AuCT	$4.9 \cdot 10^5$

5.1.2. Ensamblaje de nanopartículas plasmónicas mediante sistemas moleculares bifuncionales y formación de *hot spots* de tamaño controlado

En este trabajo hemos estudiado la capacidad de ensamblaje de nanopartículas de plata obtenidas por reducción con hidroxilamina (AgHX) por parte de una serie de moléculas alifáticas lineales α,ω -bifuncionales, con diferentes longitudes de la cadena carbonada. Debido a su naturaleza bifuncional, estas moléculas presentan la capacidad de actuar como ensambladores de nanopartículas, creando nanohuecos o *hot spots* de tamaño controlado. La modificación de la cadena alifática permite controlar la distancia interpartícula regulando así el acoplamiento entre los plasmones de las NPs ensambladas. Concretamente, se ha realizado un estudio comparativo de α,ω -ditiolos (DTX), α,ω -diaminas (DAX) y α,ω -dicarboxilatos (DCX) lineales conteniendo 6, 8, 10 y 12 átomos de carbono en la cadena alifática (es decir, X=6, 8, 10 y 12). Se ha investigado el efecto del grupo funcional, longitud de la cadena y la fracción de recubrimiento sobre la capacidad ensambladora de estos compuestos y la distancia interpartícula.

El ensamblaje de las nanopartículas se estudió a dos niveles diferentes: macroscópico y microscópico. A nivel macroscópico se llevó a cabo un estudio mediante espectroscopía de resonancia de plasmón, y a continuación se analizó el comportamiento de las partículas a nivel microscópico mediante espectroscopía con modulación espacial y microscopía electrónica de transmisión. Asimismo, la espectroscopia SERS permitió estudiar los cambios estructurales experimentados por estos ensambladores al ser adsorbidos sobre las NPs metálicas.

Análisis de los espectros de resonancia de plasmón

La Figura 5.8 muestra los espectros de resonancia de plasmón del coloide AgHX a concentraciones diferentes de ditiolos DT6, DT8 y DT10. A concentraciones muy bajas del ensamblador, cuando la adsorción de éste aún se encuentra en régimen de sub-monocapa, la agregación es reducida, y se forman agregados de pocas partículas. Al aumentar la concentración se forman agregados de mayor tamaño, lo que conduce a un descenso en la extinción producida por partículas aisladas (a 410 nm) y la aparición de

una banda más ancha a mayores longitudes de onda. Esta banda aumenta considerablemente su intensidad a partir de una concentración determinada del ensamblador, que llamaremos C_1 . Esta concentración depende de su estructura, siendo tanto menor cuanto mayor es la afinidad del ensamblador por la superficie.

Este efecto también se manifiesta en los otros ensambladores bifuncionales empleados, es decir, diaminas y dicarboxilatos (Anexo I). La concentración C_1 depende de la afinidad de los grupos funcionales por la superficie. La Tabla 5.2 recoge los valores de C_1 observados para cada ensamblador. El valor de esta concentración aumenta en el sentido DCX>DAX>DTX, lo que indica una afinidad mayor de ditioles en relación a las diaminas y, por último, se encuentran los dicarboxilatos.

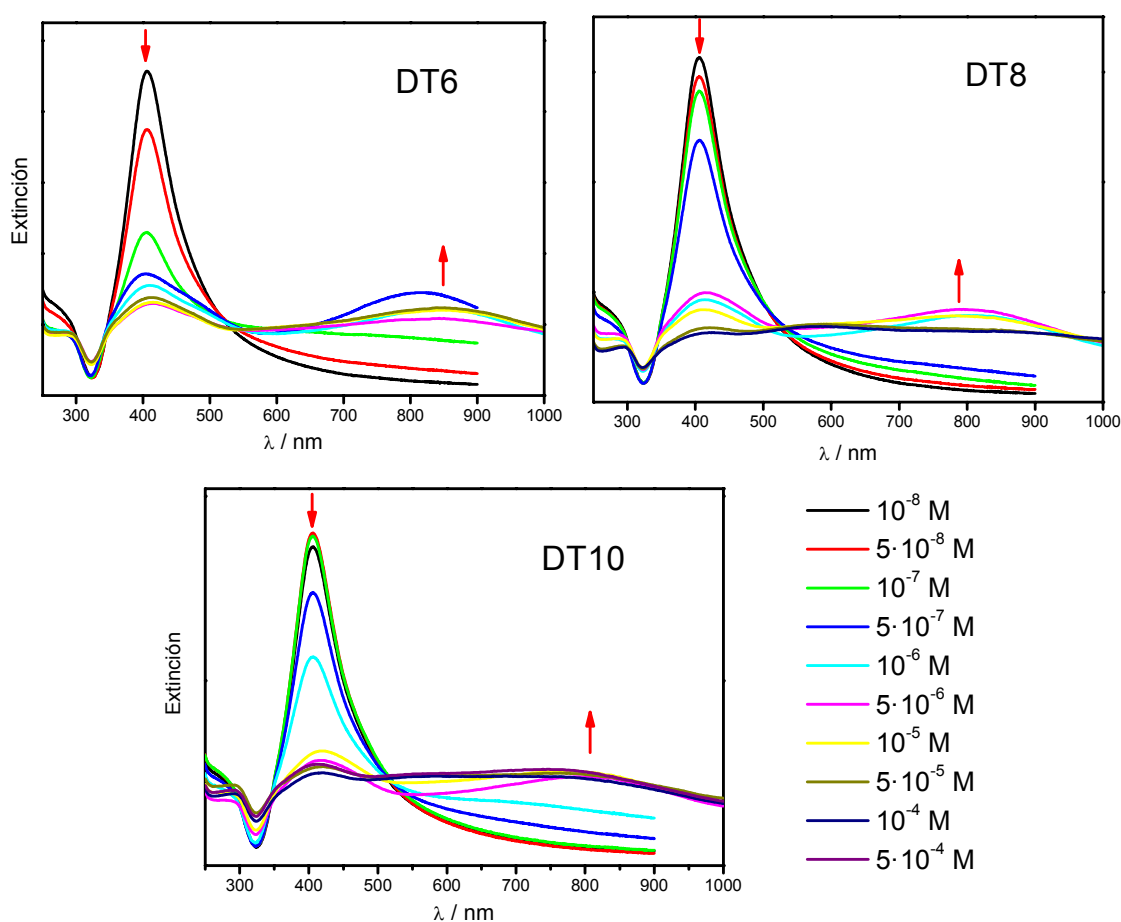


Figura 5.8. Espectro de extinción del coloide de AgHX agregado con concentraciones crecientes de DT6, DT8 y DT10.

Tabla 5.2: Concentraciones C_1 de los diversos ensambladores necesarias para iniciar la agregación de NPs de Ag.

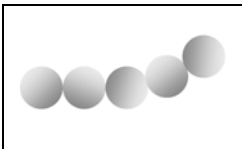
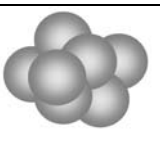
\bar{X} (N° de C)	[DCX] (mol·L ⁻¹)	[DAX] (mol·L ⁻¹)	[DTX] (mol·L ⁻¹)
6	10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁷
8	10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁵	10 ⁻⁷
10	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷
12	5x10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	

En lo referente a la morfología de los agregados, los ditiolos presentan un caso particular. Debido a que, como se comprobará más adelante, su adsorción sobre la plata es de naturaleza covalente, la variación en la carga superficial de las partículas se ve alterada en menor medida que en el caso de la agregación con diaminas por lo que la repulsión electrostática entre las NPs se mantiene. Así pues, cuando se trabaja con recubrimientos de la superficie dentro del régimen de sub-monocapa, la agregación de NPs está controlada por la velocidad de difusión de las NPs, debido a la todavía alta carga residual de las mismas y al escaso número de puntos de unión entre ellas. Se induce entonces una agregación tipo DLCA (Diffusion Limited Colloid Aggregation) ^[161], que comienza por la formación de agregados de pequeño tamaño, como dímeros o trímeros, a C_1 . Este régimen de agregación se mantiene, exclusivamente en el caso de los ditiolos, en un intervalo de concentraciones superior, en el que se comienza a generar la formación de estructuras en cadena, como demuestran las micrografías TEM de la siguiente sección, y como se ha observado con anterioridad en estudios de coloides con tioles ^[32]. Cuando la concentración de ditiol es tal que se forman multicapas sobre las NPs se produce una disminución considerablemente de la carga residual de las NPs que reduce la repulsión entre las mismas. La agregación está ahora controlada por la reacción entre el tiol y la superficie y no por la difusión de las NPs. Por tanto, se produce a una transición en el mecanismo de agregación a un régimen RLCA (Reaction Limited Colloid Aggregation) ^[161]. La concentración de ensamblador que cambia el régimen de agregación de DLCA a RLCA la llamaremos C_2 . En el régimen RLCA las NPs pasan a formar agregados globulares que resuenan a longitudes de onda significativamente inferiores ^[162], tal como se mostrará más adelante.

La Figura 9.2 del Anexo I muestra en mayor detalle el desplazamiento en la resonancia de plasmón observado cuando se cambia de régimen de agregación, que da lugar a la aparición de la banda de agregados globulares. La Tabla 5.3 recoge las concentraciones mínimas a las que se observan agregaciones lineales y globulares (C_1 y

C_2 , respectivamente) para cada uno de los ditiolos estudiados. Se observa que el valor de estas concentraciones disminuye al aumentar la longitud de la cadena debido al diferente efecto de cada ensamblador sobre las propiedades interfaciales de las NPs.

Tabla 5.3. Concentraciones mínimas para la formación de agregados lineales y globulares en AgHX al adicionar α,ω -ditiolos.

		
DT6	$5 \cdot 10^{-6}$ M	$5 \cdot 10^{-4}$ M
DT8	$5 \cdot 10^{-6}$ M	10^{-4} M
DT10	10^{-6} M	10^{-5} M

Como el ensamblaje inducido por las moléculas bifuncionales no es completo y muchas nanopartículas quedan sin agregar, se han obtenido espectros de extinción diferencia con el fin de observar en mayor detalle los agregados formados. Estos espectros diferencia se obtuvieron restando al espectro del coloide en presencia de ensamblador, el espectro del coloide sin agregar hasta eliminar la banda de resonancia correspondiente a la banda de la partícula aislada a 410 nm. De esta manera, los espectros diferencia resultantes se deben exclusivamente a los cambios generados en el coloide por la adsorción de la molécula (Figura 5.9).

Los espectros diferencia muestran tres bandas fundamentales que denominaremos A, B y C. La banda A, centrada a 360 nm, puede atribuirse a partículas de menor tamaño presentes en pequeñas proporciones y que no sufren una agregación intensa. Estas se caracterizan por una elevada carga superficial, y por tanto también por una repulsión electrostática mayor que aquellas de tamaño medio, lo que impide su agregación.

La banda B aparece entre 400 y 500 nm y sólo cuando la agregación ocurre de forma ordenada por efecto del ensamblador. Esta banda se atribuye a la resonancia de plasmón de los dímeros formados en primera instancia durante el proceso de ensamblaje de nanopartículas, tal como se ha demostrado en trabajos anteriores^[91, 163]. La posición de esta banda se encuentra significativamente desplazada hacia menores longitudes de onda, respecto a los valores esperados por los cálculos teóricos^[13] y los correspondientes a sistemas moleculares más robustos, como los compuestos

aromáticos viológenos ^[31]. Esta diferencia puede ser debida a dos efectos: a) una mayor distancia interpartícula entre nanopartículas por una posible formación de multicapas de los ensambladores alifáticos, o bien b) a la contribución mayoritaria a la banda B de dímeros formados por nanopartículas de diámetros menores a la media.

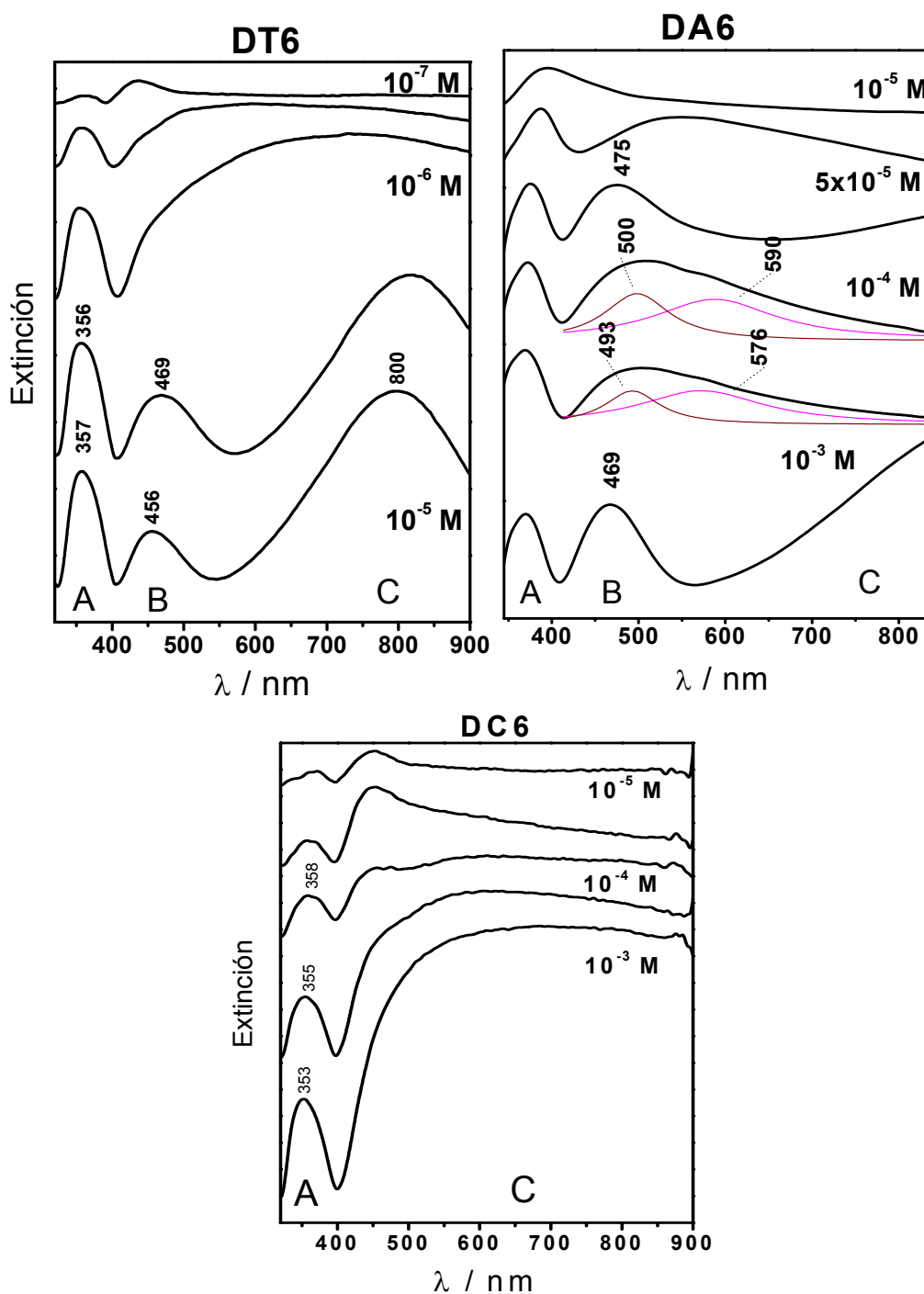


Figura 5.9. Espectros diferencia de resonancia del plasmón del coloide de AgHX registrados al adicionar DT6, DA6 y DC6, a diferentes concentraciones según se indica en la figura.

Asimismo, la posición de la banda B es variable: depende de la longitud de la cadena del ensamblador y del recubrimiento de la superficie metálica. Un aumento en cualquiera de estos factores produce un desplazamiento de esta banda hacia longitudes de onda más bajas, como se observa en la figura 5.10, en donde se representa la posición de esta banda a distinta concentración de ditiolos y diaminas de longitud de cadena variable. Se observa también que, para moléculas con la misma longitud y recubrimientos equivalentes, la posición de la banda B es significativamente coincidente.

La resonancia del plasmón en dímeros depende de la distancia interpartícula ^[13, 159] de tal modo que un aumento de esta distancia produce un desacoplamiento de los plasmones de cada partícula y, en consecuencia, un desplazamiento de la resonancia del dímero hacia longitudes de onda más bajas. Este es exactamente el comportamiento observado en la banda B en los espectros diferencia al aumentar tanto la longitud de la cadena como el recubrimiento de la superficie (Figura 5.10a y b), que son precisamente los factores que modifican la distancia interpartícula en una configuración metal-molécula-metal. En la Figura 5.10c se representa la posición de la banda B en función de la longitud de cadena en DTX y DAX. La alta correlación encontrada para estos ensambladores en condiciones de recubrimiento similar indica que las dimensiones de los espacios interpartícula están claramente influenciadas por las características estructurales de los ensambladores.

Finalmente, la banda C es más ancha y aparece a mayores longitudes de onda, corresponde a resonancias de plasmón de agregados formados por más de dos nanopartículas. Esta banda presenta una mayor intensidad relativa en los espectros diferencia debido a la formación de gran número de agregados de gran tamaño. En el caso de los ditiolos, se observa que la banda C aparece a mayores valores de longitud de onda en el régimen DLCA, mientras que se desplaza hacia longitudes de onda más bajas al aumentar la concentración por encima de C_2 , hasta inducir una agregación RLCA. Como ya se ha dicho, este desplazamiento se asocia a un cambio en la morfología de los agregados de lineales a globulares, como se verá también más adelante en el estudio por microscopía.

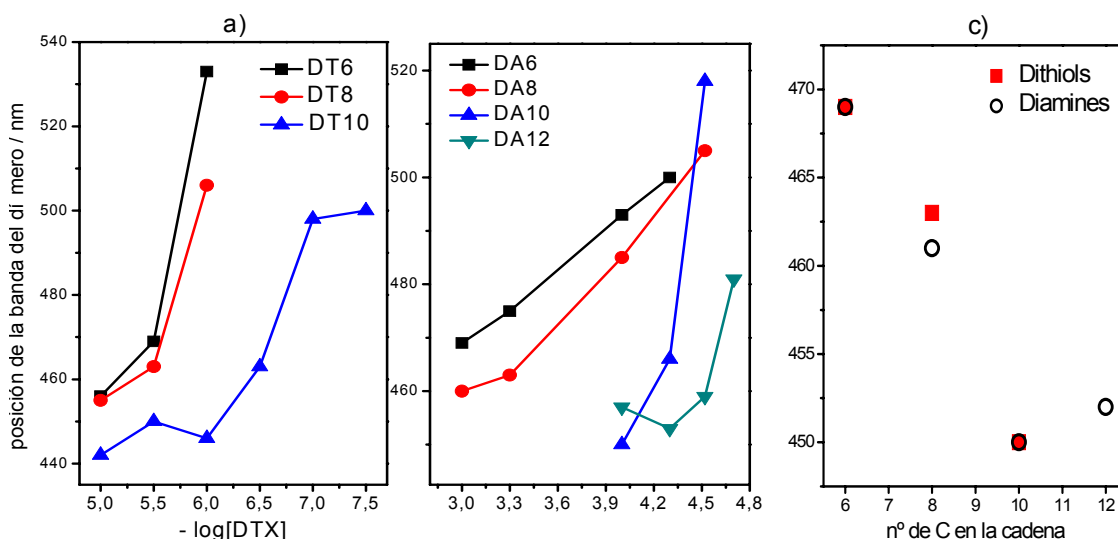


Figura 5.10. Cambios en la posición de la banda B al disminuir la concentración de ditiolos (a) y diaminas (b). La figura (c) representa la posición de la banda B en función de la longitud de la cadena de DTX y DAX en las mismas condiciones de recubrimiento.

Por último, las NPs de Ag agregadas con dicarboxilatos no muestran la banda B incluso a altas concentraciones de dicarboxilato (Figura 5.9). De este resultado se deduce que la adsorción de DCX provoca únicamente una desestabilización de la doble capa, induciendo una agregación de carácter débil y desordenada, al contrario que en el caso de DAX y DTX. Por lo tanto, estas moléculas no agregan NPs debido a su naturaleza bifuncional y no son adecuadas para la formación de HS de tamaño controlado.

Estos resultados sugieren que las propiedades ópticas de los agregados resultantes se pueden controlar mediante selección adecuada de los ensambladores moleculares. Es decir, variando la longitud de la cadena y los grupos funcionales que se unen al metal.

Espectroscopía con Modulación Espacial y Microscopía Electrónica de Transmisión

La estructura de los agregados formados por ensamblaje con agentes bifuncionales se estudió en más detalle con microscopía TEM. Asimismo, la técnica de espectroscopía de modulación espacial (SMS), por combinar una elevada sensibilidad capaz de registrar espectros de nanoobjetos aislados con una elevada resolución espacial, se ha empleado también para correlacionar las estructuras observadas con su espectro de extinción particular.

Así pues, se estudiaron los espectros UV-visible de dímeros de NPs de plata correspondientes a un coloide de AgHX formados por ensamblaje con DT6. Para ello se seleccionó una concentración 10^{-6} M de ditiol, que corresponde a un recubrimiento sub-monocapa y la agregación da lugar a agregados de pequeño tamaño, con el propósito de obtener el mayor número posible de dímeros. La figura 5.11 muestra los espectros de dos dímeros aislados, junto a los de sus componentes longitudinal y transversal.

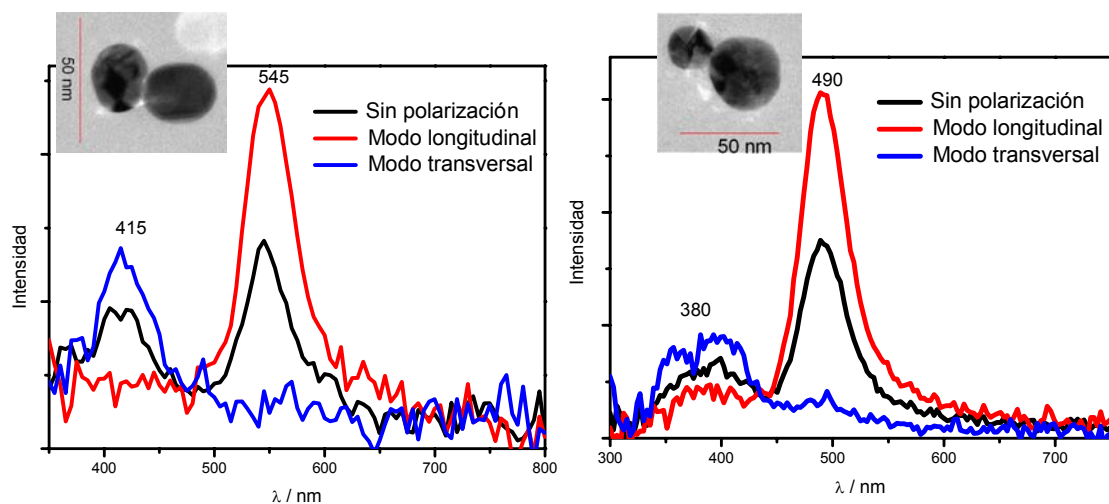


Figura 5.11. Espectro de extinción e imágenes TEM de dos dímeros ensamblados con DT6 analizados con espectroscopía de modulación espacial.

Al observar los agregados individualmente en lugar de estudiar un promedio, se observa que pequeñas diferencias en forma, tamaño o distancia entre las partículas pueden causar diferencias significativas en el espectro de resonancia de plasmón. De este modo, los dímeros constituidos por partículas de tamaño medio (diámetro de 35 nm, Figura 5.11 izquierda), presentan bandas de plasmón relacionadas con las oscilaciones transversal y longitudinal a 410 y 550 nm, mientras que en dímeros formados por partículas de tamaño inferior a la media (Figura 5.11, derecha, los dímeros mostrados en la imagen TEM están integrados por NPs de 38 y 24 nm de diámetro) estos máximos se desplazan hacia longitudes de onda notablemente inferiores (360-400 y 490 nm, respectivamente).

A la luz de estos resultados, resulta plausible que las dos primeras bandas observadas en los espectros diferencia (Fig. 5.9) sean debidas a las resonancias de nanopartículas de pequeño tamaño con menor tendencia a la agregación, que se encuentren o bien aisladas, o formando dímeros.

La Figura 5.12 muestra las micrografías obtenidas por microscopía TEM al ensamblar NPs del coloide AgHX mediante adición de DT8 a diferentes concentraciones seleccionadas entre las tres zonas determinadas por C_1 y C_2 . El coloide sin agregar está constituido principalmente por nanopartículas aisladas (Figura 5.12a). A bajas concentraciones de ditiol (5×10^{-7} M), se forman principalmente agregados de pequeño tamaño (5.12b). Cuando se aumenta la concentración de ensamblador hasta recubrimiento sub-monocapa (10^{-6} M) la adsorción del ditiol induce la formación de cadenas (Figs. 5.12c y 5.12d), responsables de las bandas de extinción a ca. 800 nm (Figura 5.8). Finalmente, a concentraciones suficientemente altas como para producirse un autoensamblaje multicapa (10^{-5} M) se observan predominantemente agregados globulares (5.12e), con una resonancia de plasmón alrededor de 600 nm.

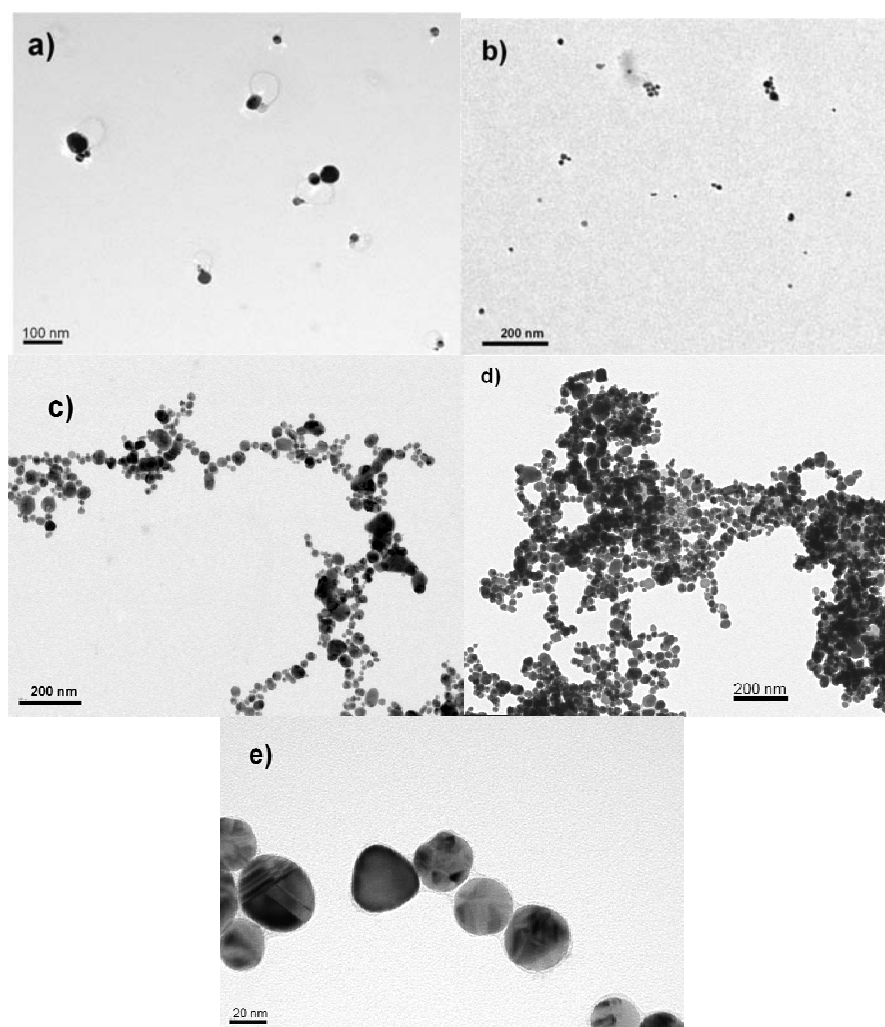


Figura 5.12. Imágenes TEM del coloide de plata con concentraciones crecientes de DT8: a) antes de la agregación; b) 5×10^{-7} M; c) 10^{-6} M, d) 10^{-5} M; e) Detalle de un agregado recubierto de DT8.

Las micrografías TEM muestran que las NPs se sitúan a una distancia muy próxima, pero no están en contacto. Al aumentar la concentración de ensamblador también lo hace la distancia interpartícula, que en el caso de los DTX llega a ser controlable en el intervalo 0,5-5,0 nm. La distancia mínima viene dada por la agregación generada a bajas concentraciones, cuando los ditioles se adsorben en régimen de submonocapa, mientras que a altas concentraciones se produce la formación de multicapas que da lugar a un aumento importante de esta distancia. Estas multicapas son claramente visibles en algunos agregados como el que se muestra en la Figura 5.12e.

La formación de cadenas lineales produce la creación de gran número de HS en la suspensión por el ensamblaje inducido por los DTX. Las características de estos HS están más controladas para concentraciones de DTX comprendidas entre C_1 y C_2 , ya que entre estas dos concentraciones se genera una cantidad óptima de cadenas sin que se produzcan modificaciones sustanciales en las distancias interpartícula por la formación de multicapas.

5.2. Funcionalización de nanopartículas

En esta sección se presentan los resultados obtenidos con la funcionalización de algunas de las nanopartículas metálicas fabricadas en esta Tesis Doctoral. Como se mencionó en la sección 2.4, mediante el empleo de moléculas receptoras se pretende modificar las características químicas superficiales del metal sin perjuicio de sus propiedades plasmónicas. La finalidad principal de la funcionalización es la de crear un ambiente afín y poco agresivo al analito en la superficie de la nanoestructura, así como la formación de cavidades donde el analito puede alojarse, de tal forma que sea posible su acercamiento a la superficie y su consiguiente detección mediante SERS, a la vez que se impida su degradación mediante procesos catalíticos o fotodegradación.

La funcionalización de las nanopartículas ha sido realizada en esta Tesis siguiendo dos estrategias, dependiendo del tipo de molécula receptora y de la cavidad resultante.

Si se emplean moléculas bifuncionales se generan *cavidades intermoleculares*, de dimensiones variables según la estructura de las moléculas dando lugar a interacciones por contacto. Para la funcionalización de NPs con ensambladores bifuncionales se han empleado los α,ω -ditiolos y dicarboxilatos alifáticos con longitud de cadena variable que se han visto en la sección anterior. Se utilizaron también en este trabajo moléculas bifuncionales aromáticas como funcionalizadores de nanopartículas de Au y Ag. En concreto, se empleó la lucigenina, un viológeno dicatiónico con gran capacidad de unir nanopartículas^[15, 30, 31]. Sin embargo, mediante el uso de este compuesto no se obtuvieron resultados significativos en la detección de sustancias de dopaje deportivo con poca afinidad por los metales.

Por otra parte, se han ensayado moléculas receptoras de inclusión que presentan *cavidades internas* de dimensiones fijas capaces de encapsular otras sustancias con baja afinidad por la superficie metálica y, por tanto, difíciles de estudiar mediante SERS. El empleo de estas moléculas permite la formación de monocapas sobre la superficie de características más robustas que los compuestos bifuncionales. Este es el caso del ditiocarbamato de β -ciclodextrina empleado en esta Tesis.

La adsorción de moléculas receptoras sobre las NPs da lugar a una nueva interfase sobre las NPs que es necesario caracterizar para evaluar en más detalle la potencialidad analítica de la técnica SERS. En esta sección se aplica la propia técnica

SERS para la caracterización estructural de las moléculas receptoras empleadas una vez adsorbidas sobre las superficies metálicas que funcionalizan.

5.2.1. Funcionalización con moléculas bifuncionales

En la sección anterior se ha visto que los ensambladores bifuncionales son capaces de interactuar con la superficie de las NPs en suspensión induciendo un ensamblaje con características distintas según las condiciones empleadas. La técnica SERS permite el estudio de los cambios en la estructura molecular de ditiolos y dicarboxilatos al variar el recubrimiento de la superficie, permitiendo deducir el mecanismo de adsorción que tiene lugar en cada caso.

Los ditiolos presentan intensos espectros SERS, a pesar de tratarse de moléculas de naturaleza alifática (Figura 5.13). Esta intensificación es atribuida al hecho de que gran parte de la señal SERS medida se debe a los ditiolos localizados en los HS inducidos por su propia adsorción. Los espectros SERS aportan gran cantidad de información sobre los mecanismos de adsorción de las moléculas lineales α,ω -bifuncionales sobre el coloide de plata. En la literatura pueden encontrarse ejemplos sobre estudios SERS de tioles y ditiolos lineales^[92, 162, 164-167]. Sin embargo, la adsorción de ditiolos alifáticos de diferente longitud no ha sido estudiada en profundidad hasta la fecha.

Comparando los espectros SERS de los ditiolos con los correspondientes espectros Raman normales de los compuestos líquidos puros, se observa un debilitamiento o completa desaparición de la banda $\nu(\text{S-H})$ a 2572 cm^{-1} , así como una gran intensificación de las bandas $\nu(\text{C-S})$, que aparecen en la región $600\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, las cuales se desplazan hacia menores frecuencias. Esto indica una interacción del tiol a través de los grupos SH con la superficie del metal, lo que implica una rotura del enlace S-H y la formación de un nuevo enlace Ag-S, el cual se manifiesta mediante una nueva banda a alrededor de 210 cm^{-1} , sólo observable a altas concentraciones del ditiol.

El debilitamiento de bandas correspondientes a los modos vibracionales del grupo CH_2 , en particular las asignadas a δCH_2 ($1430\text{-}40\text{ cm}^{-1}$) y tCH_2 (1300 cm^{-1}), así como la intensificación de bandas asignadas a las vibraciones ωCH_2 (1335 y 1195 cm^{-1}) y $\nu\text{C-C}$ en las cadenas alifáticas ($1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$) permiten deducir (teniendo en cuenta

las reglas de selección descritas en la sección 2.3) una orientación de los ditiolos adsorbidos preferentemente perpendicular respecto a la superficie.

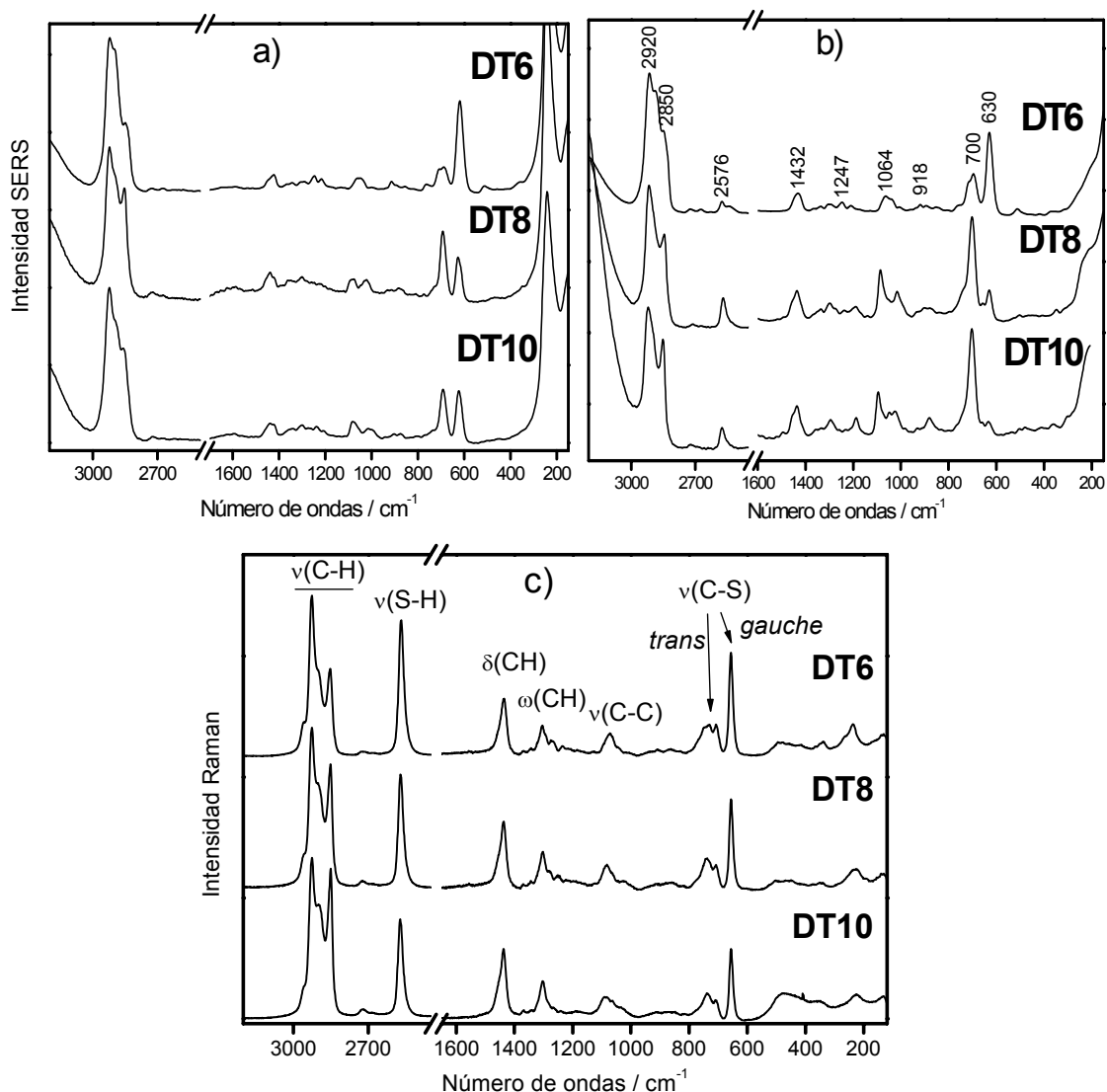


Figura 5.13. Espectros SERS de DT6, DT8 y DT10 a las concentraciones: a) 10^{-6}M , b) $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$, y c) espectros Raman de los líquidos puros.

El empaquetamiento de estos ditiolos sobre la superficie depende de la longitud de la cadena y del recubrimiento de la superficie a una cierta concentración del adsorbato. Por lo tanto, **empaquetamiento** y **recubrimiento** son dos variables directamente relacionadas.

El recubrimiento de la superficie puede seguirse mediante la variación de las bandas de $\nu\text{Ag-Cl}$ (240 cm^{-1}), siempre presente en el coloide AgHX ya que se prepara a partir de la forma clorhidrato de la misma. Al aumentar el recubrimiento disminuye la banda $\nu\text{Ag-Cl}$ por desplazamiento del Cl^- de la superficie, y aumenta la banda debida a

la $\nu\text{Ag-S}$. A altos recubrimientos se observa también un restablecimiento de la banda $\nu\text{S-H}$ (a 2576 cm^{-1}) que no obstante presenta una intensidad mucho menor que en el espectro Raman del líquido puro (Fig. 5.13c). Esto indica la presencia de grupos $-\text{SH}$ libres en el espacio interpartícula que determina el *hot spot*, debido probablemente a un autoensamblaje de los ditiolos para dar lugar a multicapas.

El empaquetamiento puede seguirse mediante las bandas correspondientes a las νCH_2 simétrica (2850 cm^{-1}) y antisimétrica (2920 cm^{-1}), y mediante la relación de las bandas a 700 cm^{-1} y 630 cm^{-1} , debidas a las vibraciones de $\nu\text{C-S}$ en conformaciones *trans* y *gauche*, respectivamente^[167]. Así, los valores I_{2850}/I_{2920} y I_{700}/I_{630} están relacionados proporcionalmente con el empaquetamiento lateral de las cadenas alifáticas y, por lo tanto, con el grado de ordenación de las mismas. Los valores de estas relaciones de intensidad se representan para los distintos DTX a diferentes concentraciones en la figura 5.14. Se observa que el aumento de la longitud de la cadena o de la concentración de DTX produce un incremento en la relación de intensidades anteriores, lo que indica un mayor empaquetamiento lateral.

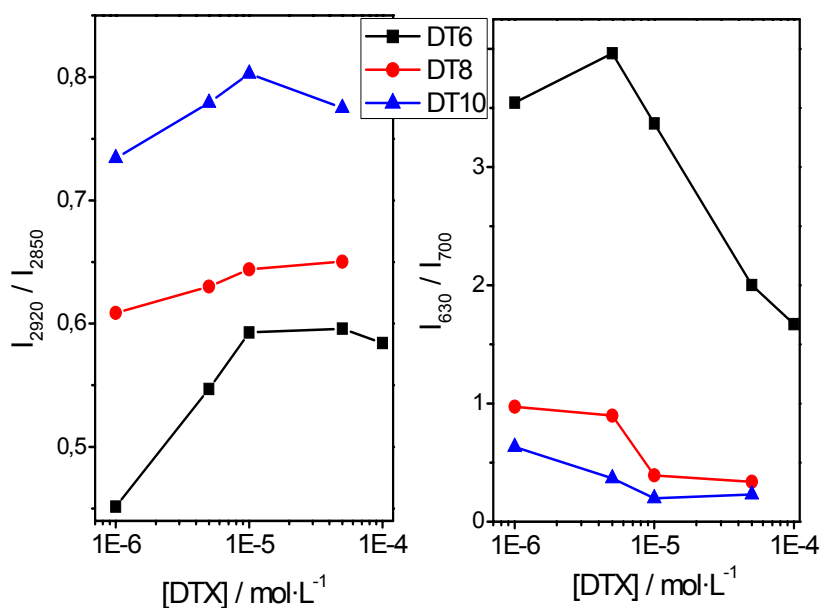


Figura 5.14. Representación de las relaciones de intensidades I_{2850}/I_{2920} (izquierda) y I_{630}/I_{700} (derecha) al variar la longitud de la cadena y la concentración de ditiol.

Por lo tanto, se deduce que cuando la concentración de ditiol se encuentra en el intervalo de sub-monocapa predominan los conformeros *gauche* existiendo un menor empaquetamiento (Figura 5.15a). Al aumentar el recubrimiento de la superficie, se induce un aumento del empaquetamiento lateral y del grado de ordenación de las

cadena con aumento de conformeros *trans*, ya que las moléculas se ven forzadas a adoptar una conformación más rígida. Las conformaciones *todo trans*, en las que la cadena alifática se encuentra totalmente estirada, tienen la mayor distancia extremo-extremo posible para una determinada molécula, lo que se traducirá en un aumento de la distancia interpartícula (Figura 5.15b). Por último, una concentración de ditiol que sobrepase el recubrimiento máximo de la superficie promoverá la formación de multicapas, lo que incrementa aún más la distancia interpartícula (Figura 5.15c).

Así pues, los cambios observados en los espectros SERS justifican los desplazamientos hacia el azul de la banda del dímero encontrados al ensamblar las nanopartículas con diaminas y ditiolos, según aumentan la concentración del compuesto y la longitud de la cadena (banda B de los espectros diferencia, sección 5.1.2).

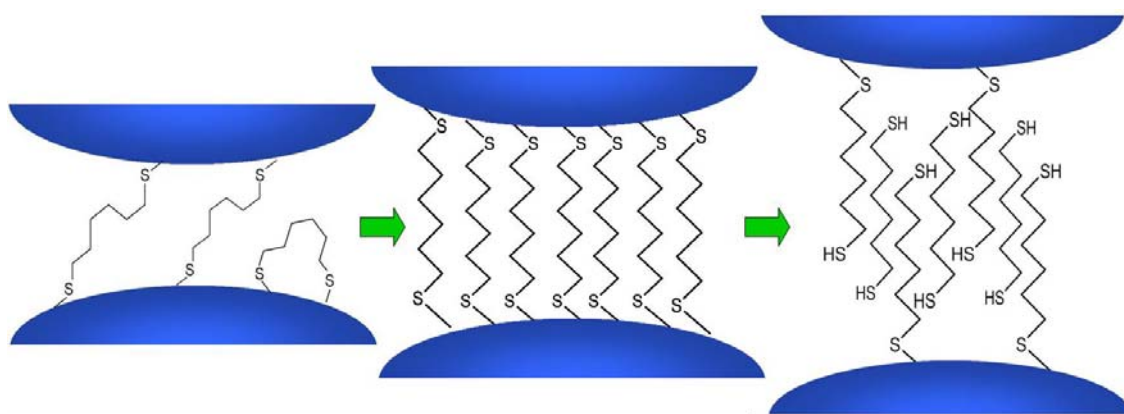


Figura 5.15. Representación esquemática de los diferentes modelos de adsorción de ditiolos deducidos a partir de los espectros SERS, con los cambios estructurales en las moléculas al variar el recubrimiento de la superficie y la consiguiente variación de la distancia entre NPs.

Los espectros SERS de dicarboxilatos se muestran en la Figura 5.16, junto con los espectros Raman de los cuatro ácidos carboxílicos estudiados en estado sólido. Mientras que los espectros Raman convencionales de estos compuestos presentan importantes diferencias en la región de $\nu\text{C-H}$, entre 2800 y 3000 cm^{-1} , los espectros SERS en esta zona son prácticamente idénticos, presentando una sola banda ancha centrada a 2920 cm^{-1} .

La banda asignada a $\nu\text{C=O}$, a 1645 cm^{-1} , no aparece en el espectro SERS, apareciendo otra banda a 1605 cm^{-1} en su lugar. Esta última puede deberse a tensiones de enlaces insaturados en la cadena carbonada, un cambio consistente con una deshidratación del ácido carboxílico con pérdida de hidrógeno en alfa, como sugieren

Marcos y Otero en sus estudios SERS de otros carboxilatos lineales^[168]. Asimismo, las bandas de $\nu\text{C-C}$ que aparecen en el espectro Raman entre 1110 y 1050 cm^{-1} , desaparecen casi por completo en los espectros SERS. Por último, los aniones carboxilato presentan normalmente dos bandas intensas en SERS, una a 1390 cm^{-1} debida a $\nu\text{C-O}$ y otra a 930 cm^{-1} dada por $\nu\text{C-COO}^{[168]}$, que se encuentran ausentes en todos los espectros SERS registrados para estas moléculas.

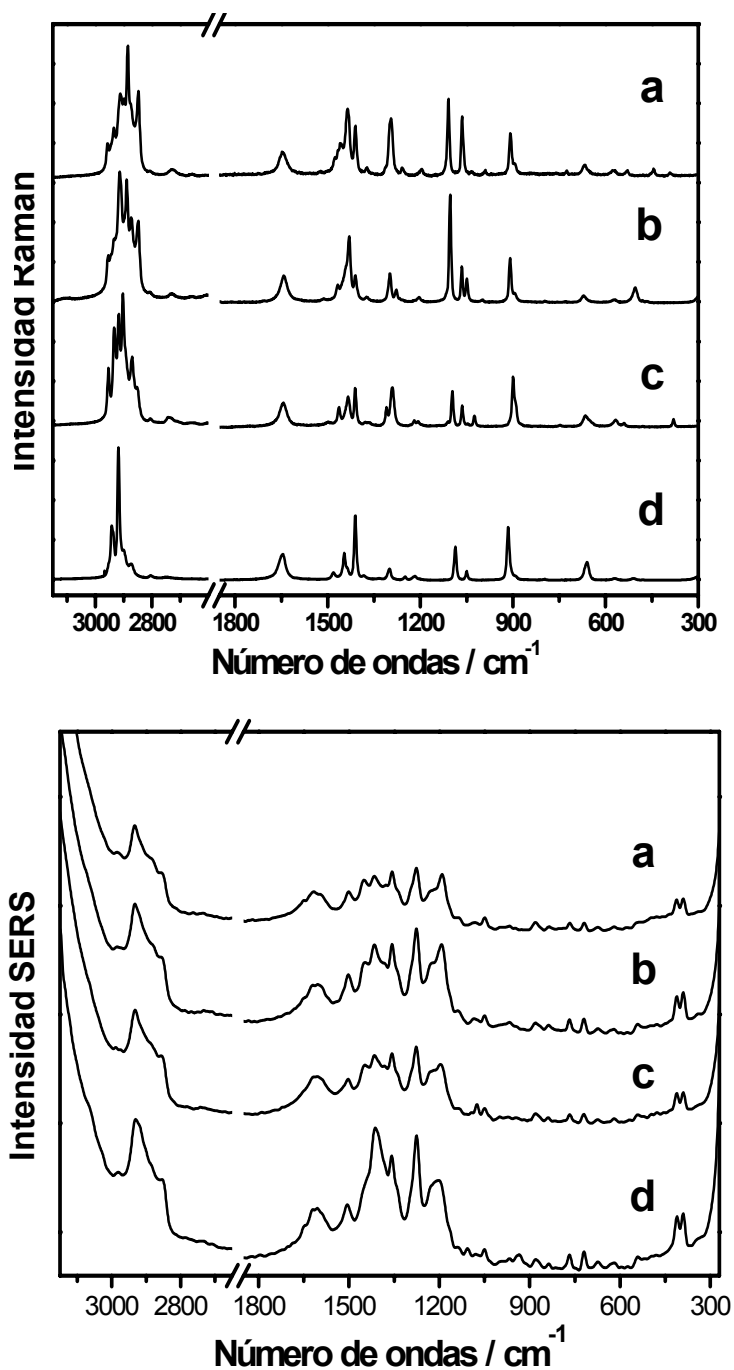


Figura 5.16. Espectros Raman (*arriba*) y SERS (*abajo*) de los ácidos dicarboxílicos DC6 (a), DC8 (b), DC10 (c) y DC12 (d).

A partir de estas observaciones puede deducirse que los ácidos dicarboxílicos sufren algún tipo de cambio químico al adsorberse en la superficie de las nanopartículas, y, por lo tanto, su actividad como ensambladores bifuncionales queda claramente limitada.

5.2.2. Funcionalización con β -ciclodextrina derivatizada con un grupo ditiocarbamato

El ácido 6-ditiocarbámico de β -ciclodextrina (DTCDH) preparado según el procedimiento descrito en la sección 4.3.2 se caracterizó mediante espectroscopias Raman e IR. Los espectros Raman se muestran en la Figura 5.17.

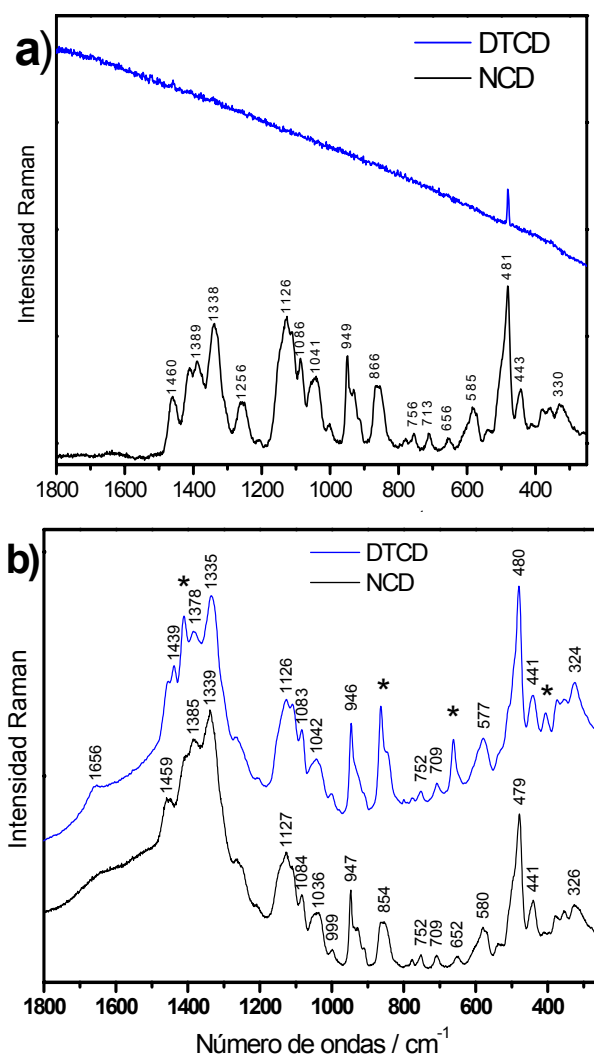


Figura 5.17. Espectros Raman de 6-monoamino- β -ciclodextrina (NCD) y ácido 6-ditiocarbámico- β -ciclodextrina (DTCDH) en estado sólido, registrados con excitación a 532 (a) y 785 nm (b). Las bandas marcadas con asterisco corresponden a la DMF.

Al utilizar como fuente de excitación el láser a 532 nm, se observa que DTCDH presenta una alta emisión de fluorescencia, apreciándose sólo la banda más intensa, a 481 cm^{-1} . Este efecto puede deberse restos de disolvente (dimetilformamida, DMF) que no han podido ser eliminados en el proceso de purificación del producto. Sin embargo, al emplear como excitación el láser a 785 nm la fluorescencia desaparece, observándose bandas del disolvente (marcadas con asterisco en la figura).

Los espectros Raman de las β -CD estudiadas presentan bandas debidas fundamentalmente al residuo de glucosa de la CD^[169], mientras que las bandas características de los grupos funcionales, tales como el grupo amino en NCD y el grupo DTC en DTCDH apenas se aprecian. Con el fin de resaltar las diferencias entre ambos espectros, se sustrajo al espectro Raman de DTCD el espectro de NCD. El espectro diferencia se muestra en la Figura 5.18.

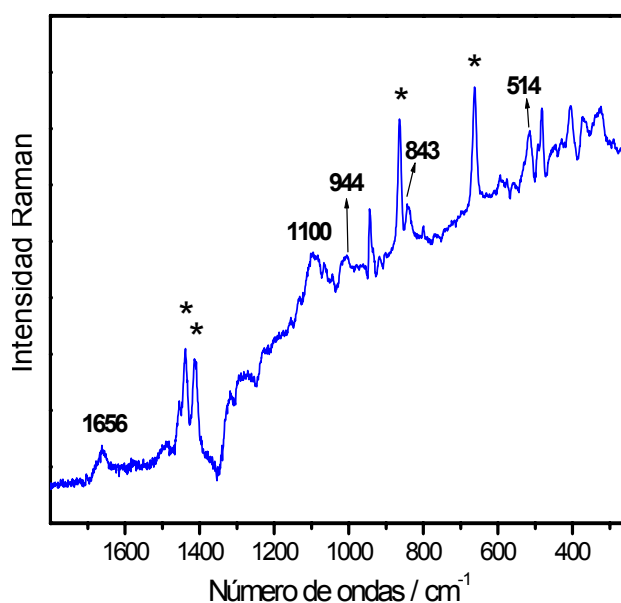


Figura 5.18. Bandas características del producto de reacción: Espectro diferencia DTCD - NCD.

Se observa una diferencia importante entre los espectros de reactivo y producto: la aparición de la banda de deformación del enlace N-H a 1656 cm^{-1} . Estas deformaciones presentan bandas más intensas y estrechas en Raman para los grupos ditiocarbamato que las correspondientes deformaciones del grupo NH_2 en aminas primarias. Este cambio se hace especialmente patente en el espectro infrarrojo (Fig. 5.19).

Asimismo, aparecen nuevas bandas a 1100, 944, 843 y 514 cm^{-1} . Las dos primeras corresponden a vibraciones de tensión de los enlaces CS doble y sencillo, respectivamente, característicos del ácido ditiocarbámico.

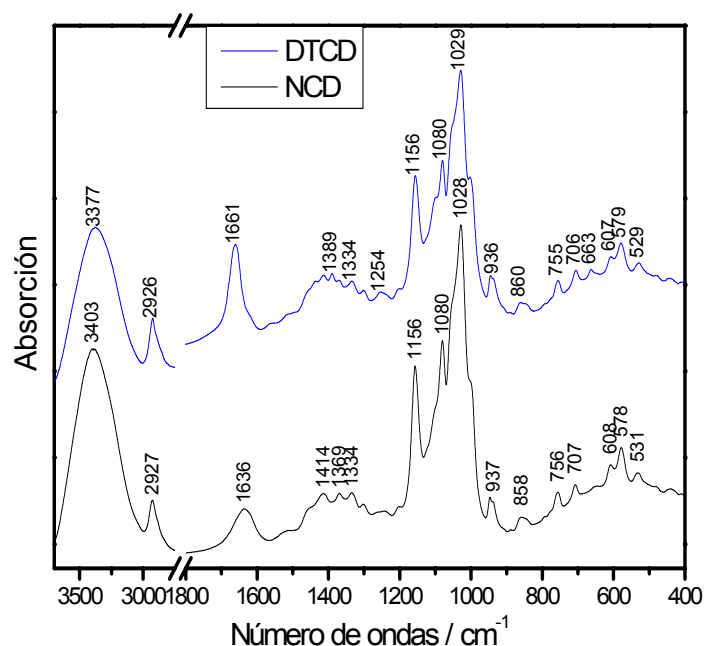


Figura 5.19. Espectros infrarrojos de DTCD y NCD

La adsorción de DTCD sobre NPs metálicas se investigó sobre coloides de Au y Ag, y se emplearon diferentes longitudes de onda de excitación (Fig. 5.20) para estudiar los diferentes espectros SERS resultantes. Para estas medidas se adicionaron 10 μL de DTCDH 0.1 M en DMF a 1 mL de coloide activado con NO_3^- .

La adsorción de DTCD sobre nanopartículas de oro es prácticamente despreciable, según se deduce de los espectros SERS resultantes que muestran solo bandas correspondientes a la DMF (Figura 5.20, abajo). Sobre plata, sin embargo, la funcionalización es más evidente ya que se registraron con éxito los espectros SERS de la ciclodextrina, destacando siempre la banda a 480 cm^{-1} , que se asigna a vibraciones de esqueleto de la molécula^[169].

Se observa que los espectros más intensos se consiguen empleando el coloide de AgCT y usando una excitación a 532 nm. A esta longitud de onda es posible el registro de espectros SERS intensos de DTCD adsorbido tanto sobre NPs de los coloides AgCT como AgHX (Figura 5.20). Esto es posible gracias a la atenuación de la fluorescencia ejercida por parte de las NPs de Ag.

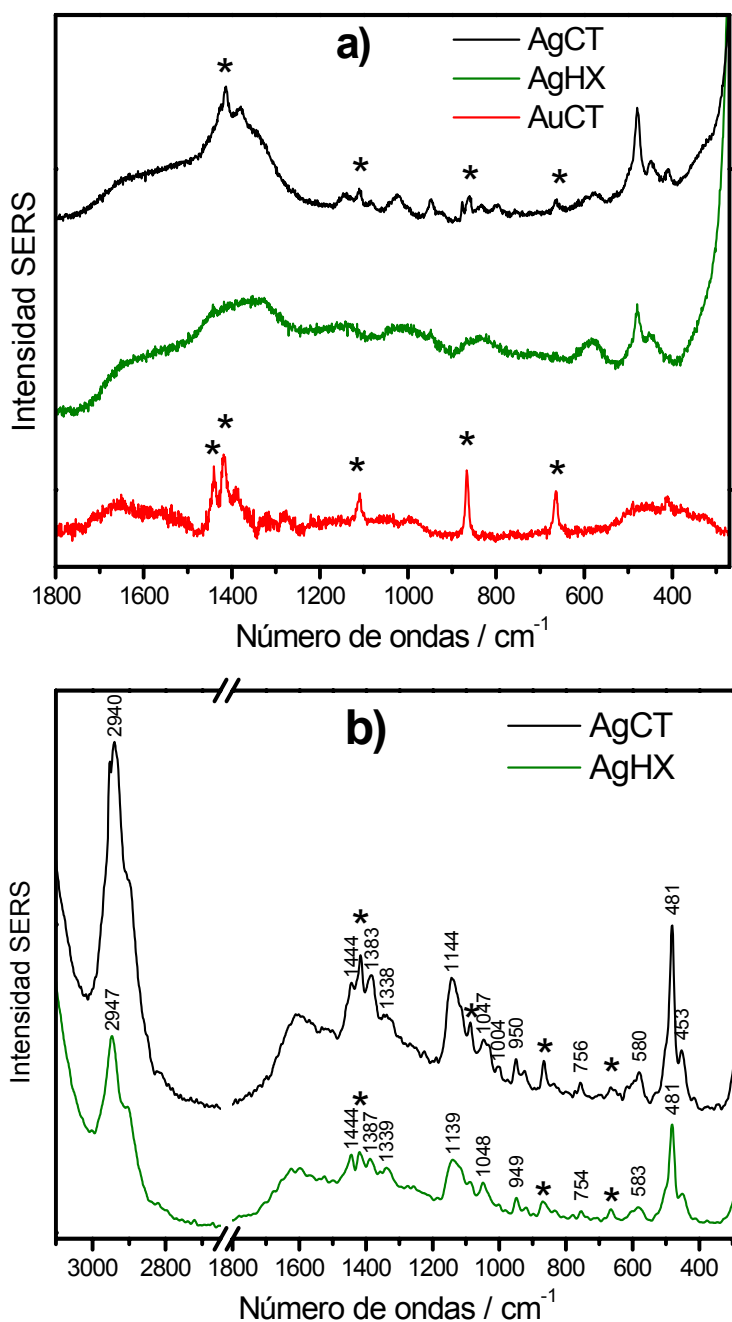


Figura 5.20. Espectro SERS de DTCD sobre varios coloides, con λ_{exc} = a) 785 nm y b) 532 nm.

La presencia de la banda SERS a 950 cm^{-1} , asignada a vibraciones $\nu(\text{CSS})$, indica la formación de un complejo bidentado entre ambos átomos de S del grupo DTC y el metal (Figura 5.21).

De este modo, los resultados SERS demuestran que la unión de DTCDH con átomos de plata en la superficie de la nanopartícula da lugar a una completa funcionalización de la misma por recubrimiento de su superficie con la ciclodextrina derivatizada. La DTCDH reacciona con la superficie de plata induciendo la desorción

de los iones citrato presentes en la superficie. Esta reacción se representa en la Figura 5.21 e implica la ionización del ácido ditiocarbámico de β -ciclodextrina (DTCDH) y la formación de un complejo del ditiocarbamato de β -ciclodextrina (DTCD) con los átomos de plata existentes en la superficie.

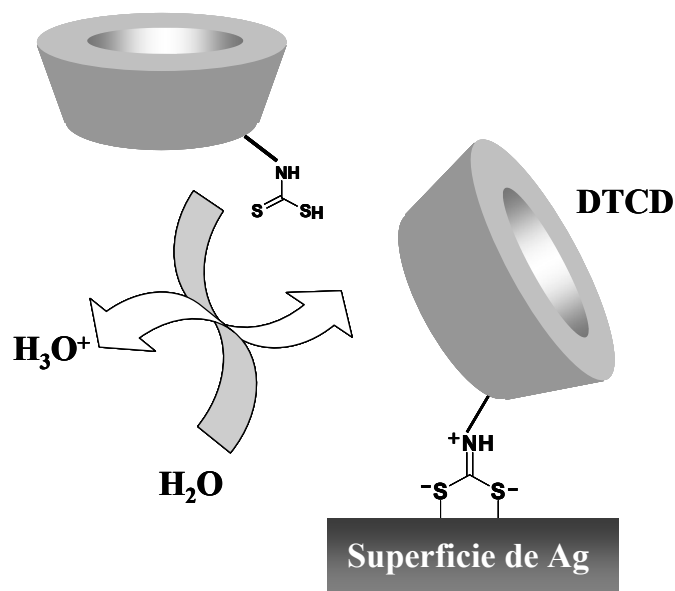


Figura 5.21. Esquema de la adsorción de DTCD sobre nanopartículas de Ag.

Finalmente, se realizó un estudio de la adsorción de la DTCD sobre AgCT, evaluando la variación de la intensidad de la banda a 480 cm^{-1} frente a la concentración de DTCD (Figura 5.22). La banda Raman $\nu(\text{O-H})$ del agua se usó como referencia de intensidad.

La Figura 5.22 muestra que la intensidad de la banda a 480 cm^{-1} de DTCD sigue una gráfica de tipo sigmoïdal alejado del modelo de adsorción de Langmuir. Esto sugiere que a bajas concentraciones de DTCD su adsorción está seriamente limitada, probablemente, por la presencia de iones citrato sobre la superficie. Sin embargo a concentraciones de DTCD superiores a 10^{-4} M se observa un significativo aumento de la intensidad SERS, que indica un incremento notable de la adsorción de DTCD sobre el metal. Por encima de 10^{-3} M se supera la solubilidad de DTCD, lo que impide continuar el estudio a concentraciones superiores. Sin embargo, a esta concentración no parece haberse alcanzado el valor máximo de intensidad SERS. Esto puede deberse a la capacidad de autoensamblaje de las ciclodextrinas^[170], que pueden acumularse sobre la superficie dando lugar a multicapas.

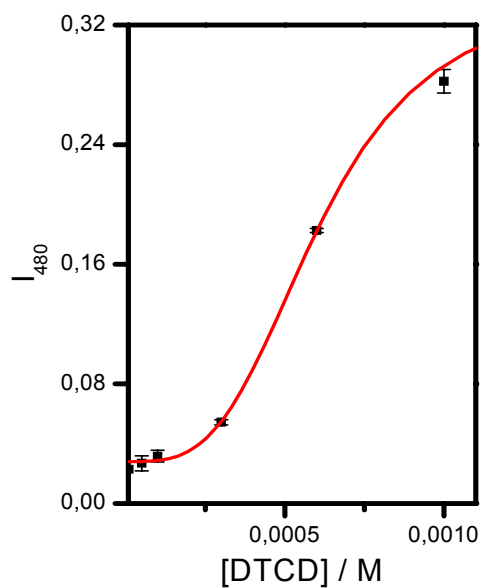


Figura 5.22. Intensidad de la banda a 480 cm^{-1} de la DTCD frente a la concentración de este mismo compuesto.

La formación de multicapas no es deseable en la funcionalización de nanopartículas de Ag, pues no se pretende obtener una óptima señal del receptor, sino del analito. Como se verá más adelante, el sistema AgCT-DTCD se consiguió aplicar con éxito a concentraciones de ciclodextrina inferiores a 10^{-3} M para la detección por SERS de sustancias de dopaje deportivo con baja afinidad por los metales, concretamente el anabolizante esteroideo nandrolona.

5.3. Detección de sustancias de dopaje deportivo mediante resonancia de plasmón

Tal como se ha explicado anteriormente (sección 2.2), la modificación de la carga superficial producida por la adsorción de moléculas sobre las nanopartículas favorece su agregación, induciendo un cambio en la resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) de la suspensión. Debido a este efecto, los agregados resultantes dan lugar a una extinción de luz, por la suma de absorción más difusión o *scattering*, a longitudes de onda mayores que las de las partículas aisladas. En términos coloidales, el desplazamiento hacia el rojo inducido por la adsorción de un adsorbato sobre la superficie del metal está relacionado con la disminución de carga de la interfase (tal como se describió en la sección 2.4). Asimismo, esta reducción de carga depende de la cantidad de adsorbato sobre la superficie. Por lo tanto, la agregación, medida como intensificación de la extinción en el rojo, resulta ser sensible a la cantidad del adsorbato en el medio y puede ser empleada en su detección.

En esta sección se muestran los resultados obtenidos a partir de la aplicación de los espectros de extinción en la detección de las SDD AGI, CB, SB y TB, por la modificación del plasmón superficial que se induce tras su adsorción sobre NPs de Ag y Au.

Por otro lado, cuando el adsorbato presenta diferentes formas ácido-básicas, con diferente carga y con diferentes afinidades por la superficie del metal, los cambios en los espectros de resonancia pueden ser empleados en la determinación de constantes de acidez o basicidad. En esta sección se muestra también la aplicación de coloides de Ag en la determinación de pK_a de AGI.

5.3.1. Medida del pK_a de aminoglutetimida sobre nanopartículas de plata

El coloide AgNPT presenta unas características especiales que lo distinguen de los sistemas convencionales usados hasta la fecha (AgCT y AgHX). Las NPs que lo integran no sólo presentan una diferente morfología, sino también unas propiedades interfaciales especiales: con el fin de favorecer el crecimiento anisotrópico de los

nanoprismas que lo integran, se adiciona una pequeña cantidad de iones Br^- que interaccionan fuertemente con la superficie de los nanoprismas de AgNPT, impidiendo la aproximación de otras especies como los iones OH^- . En consecuencia, estos coloides no sufren agregación al aumentar el pH del medio.

A pesar de la presencia de iones bromuro sobre la superficie, la aminoglutetimida (AGI) puede adsorberse sobre la superficie de los nanoprismas, induciendo una agregación de los mismos y, con ello, un cambio en la resonancia del plasmón. Sin embargo, la adición de AGI sólo produce este cambio a valores de pH superiores a 7. Esto sugiere que únicamente la forma desprotonada de esta molécula puede interaccionar con la superficie de plata (Figura 5.23), ya que la forma neutra predomina a pH alcalino de acuerdo con el siguiente equilibrio:

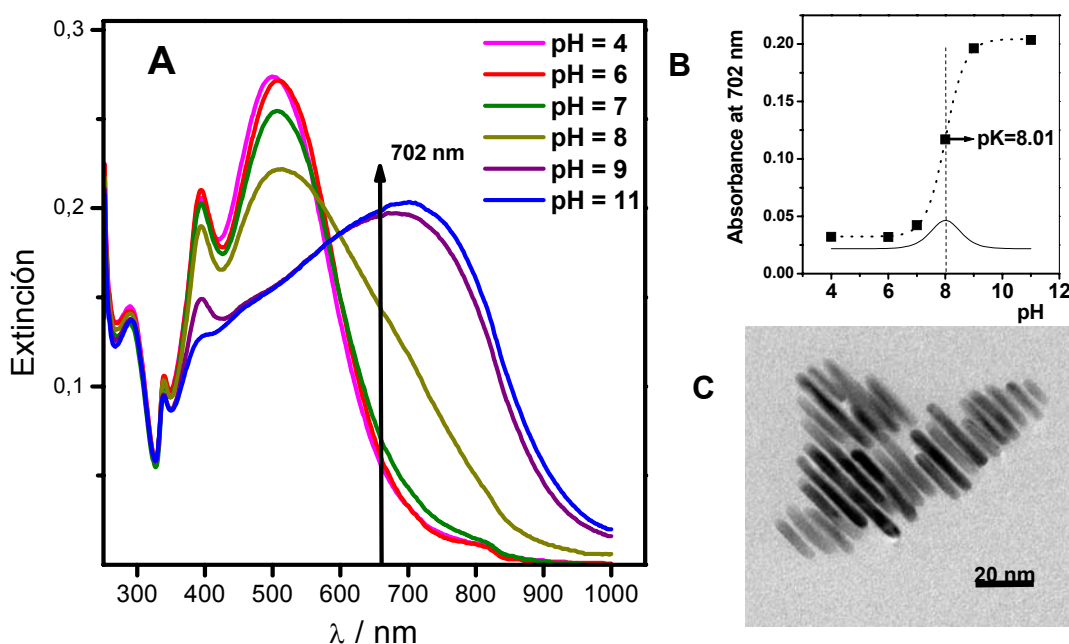


Figura 5.23. A: Espectro de extinción del coloide de AgNPT a diferentes pH en presencia de AGI (10^{-5} M). B: Variación de la extinción a 702 nm frente al pH, ajuste sigmoidal y valor de pKa calculado. C: Micrografía de un agregado de AgNPT en el que se observa apilación sobre las caras triangulares

En la Figura 5.23 se observa que la intensidad de la banda de extinción observada a 702 nm, correspondiente a la aparición de agregados como los mostrados en la Figura 5.23C, crece a medida que aumenta el pH. Por otra parte, los agregados se forman como resultado de la creciente aparición de AGI neutra tal como indica el equilibrio (5). Por lo tanto, es posible relacionar la intensidad de la banda centrada a 702 nm con la cantidad de AGI neutra en el medio. La curva de valoración A_{702}/pH que

se representa en la Figura 5.23B permite el cálculo del pKa mediante la segunda derivada numérica de la curva de ajuste, de donde se deduce un valor de pKa de la AGI de 8.01 en este medio.

Se observa también que las únicas bandas que se ven afectadas por el proceso de agregación son las correspondientes a las oscilaciones dipolares en el plano (máximo a 530 nm) y fuera del plano (máximo a 410), mientras que la banda a 340 nm debida a oscilaciones cuadrupolares fuera del plano se mantiene esencialmente constantes tanto en frecuencia como en intensidad.

5.3.2. Detección de Sustancias de Dopaje Deportivo por resonancia de plasmón en nanopartículas de oro

La intensidad de extinción medida a partir de la resonancia de los plasmones de agregados depende de la cantidad de compuesto adsorbido sobre las NPs, es decir, del recubrimiento de la superficie. Los parámetros importantes en la respuesta plasmónica de los coloides a la adsorción de una molécula son la *posición* de la resonancia de plasmón debida a los agregados y la *intensidad* del máximo de extinción.

La posición del plasmón de los agregados depende de la naturaleza tanto del sustrato metálico como del analito. La figura 5.24 muestra los espectros de extinción del coloide AuCT en ausencia y en presencia de las SDD clenbuterol (CB), salbutamol (SB), terbutalina (TB) y aminoglutetimida (AGI) a una concentración 10^{-5} M. El coloide de oro, de color rojo, presenta su máximo de extinción característico a 518 nm. Al producirse su agregación inducida por la adsorción de SDD, se observa la aparición de una nueva banda a longitudes de onda mayores correspondiente a los plasmones de los agregados formados.

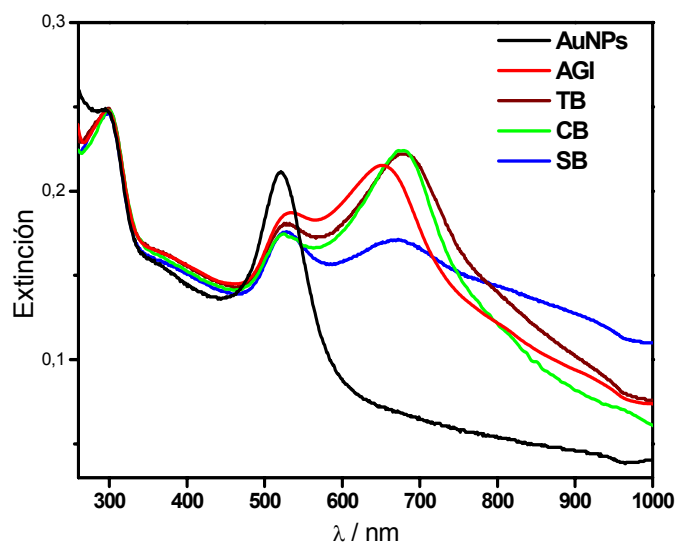


Figura 5.24. Espectro de extinción del coloide AuCT a pH 5.5 en presencia de 0,03 M de KNO_3 y 10^{-5} M de aminoglutetimida, clenbuterol, terbutalina y salbutamol.

En la Tabla 5.4 se resumen los parámetros de las bandas de extinción de los agregados formados por la adsorción de los distintos SDD estudiados. Como puede observarse, todos los agonistas β_2 presentan la banda de los agregados alrededor de los 673 nm, mientras que la adsorción de la aminoglutetimida genera una banda centrada más hacia el azul, a 654 nm. Esto se atribuye al hecho de que la AGI modifica en mayor extensión la interfase debido a su mayor tamaño, induciendo con ello una mayor agregación de las NPs. Por lo tanto, se deduce que el plasmón resulta ser sensible a la estructura molecular del analito.

Tabla 5.4. Análisis comparativo de la banda de extinción del plasmón correspondiente a los agregados de nanopartículas inducidos por la adsorción de SDD.

Compuesto	λ_{max}	$I_{\text{max}} (10^{-5}\text{M})$
Clenbuterol	677	0,228
Salbutamol	670	0,171
Terbutalina	677	0,229
Aminoglutetimida	654	0,213

La intensidad del máximo de extinción depende de la cantidad de analito adsorbida sobre el metal, por ser proporcional a la carga desplazada por el mismo. La cantidad de moléculas adsorbidas, a su vez, depende de la afinidad de las mismas por la superficie de Ag, de tal forma que se establece un equilibrio entre las moléculas adsorbidas (SDD_{ad}) y las existentes en la disolución (SDD_{dis}):



Este equilibrio está gobernado por la constante de adsorción (K_{ad}). Podría suponerse que un mismo recubrimiento superficial dará lugar a una agregación equivalente. Sin embargo, el distinto valor de K_{ad} para cada molécula hace que una misma concentración de analito dé lugar a una extensión muy distinta de la agregación. Como puede observarse en la Figura 5.24, AGI, CB y TB presentan una extinción más intensa para el plasmón de los agregados que la observada en el caso de SB. Este efecto se debe a la menor afinidad de esta molécula por el oro, tal como se demostrará más adelante comparando los valores de K_{ad} calculados a partir de los espectros SERS.

La dependencia de la intensidad de extinción con la cantidad de analito presente en el medio puede ser empleada para la detección cuantitativa del mismo. Como ejemplo, se muestran en la Figura 5.25 (izquierda) los espectros de extinción del coloide de Au a varias concentraciones de SB. La Figura 5.25 (derecha) representa, a su vez, la intensidad de la extinción de los agregados frente a la concentración de SB, CB y AGI. Puede verse una diferencia clara entre estos compuestos, de tal forma que este método demuestra una mayor sensibilidad para el CB, al producirse una interacción más fuerte con las NPs el oro.

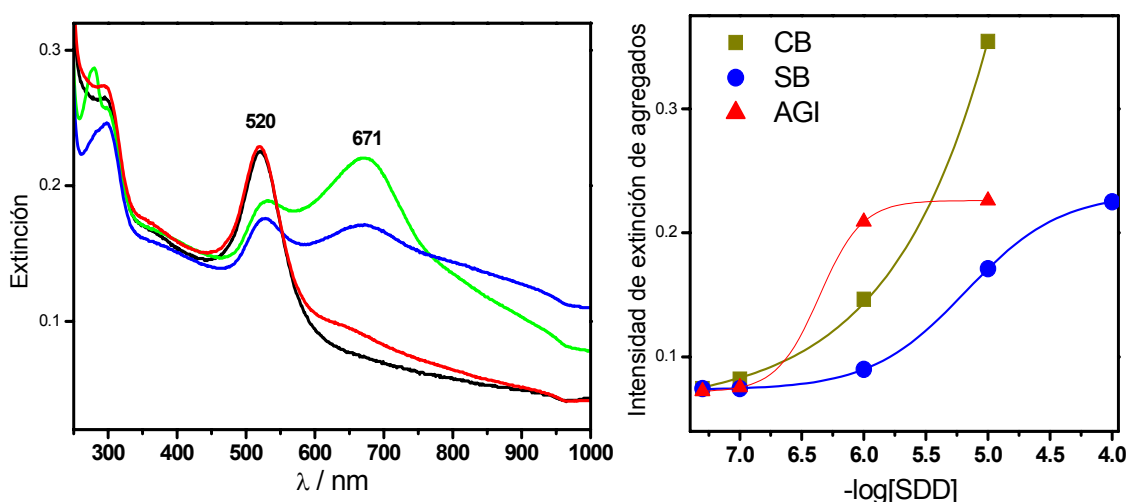


Figura 5.25. Izquierda: Espectros de extinción del coloide de oro con 0,03 M de KNO₃: a) en ausencia de analito; y en presencia de SB a las siguientes concentraciones: b) 10⁻⁶ M, c) 10⁻⁵ M, d) 10⁻⁴ M. Derecha: Intensidad de la banda de los agregados al aumentar las concentraciones de SB, CB y AGI, ajustadas a curvas sigmoidales

De los resultados mostrados arriba se deduce que la detección de analitos mediante la variación en la posición e intensidad de la banda de extinción del plasmón es poco sensible para valores por debajo del recubrimiento total de las nanopartículas

empleadas. De hecho, la banda de extinción de los agregados sólo es visible cuando el recubrimiento de la superficie es casi total, lo que ocurre a concentraciones moleculares por encima de 10^{-6} M. En consecuencia, este resultado limita seriamente la aplicación de la variación de la extinción por efecto del plasmón en la detección de estos compuestos. Asimismo, este método no permite la identificación de la sustancia, ya que no aporta información estructural específica, dando respuestas muy similares para TB y CB.

5.4. Detección mediante SERS: Aspectos cualitativos.

La caracterización y consiguiente detección de sustancias de dopaje deportivo mediante la técnica SERS presenta la ventaja de ofrecer información tanto cualitativa como cuantitativa de las moléculas estudiadas con una respuesta rápida.

Las sustancias estudiadas en este trabajo (clembuterol, salbutamol, terbutalina, aminoglutetimida, probenecid y nandrolona) son de gran interés en dopaje deportivo, y se han detectado con relativa frecuencia en los controles obligatorios de las competiciones internacionales de varios deportes. Dado que su consumo es una práctica antirreglamentaria, las sustancias con más éxito son aquellas que presentan mayores dificultades en su detección.

La aplicación del SERS para la detección de SDD presentaba el inconveniente de la escasez de estudios de vibración previos que permitieran la asignación de las bandas obtenidas en los espectros SERS. Por lo tanto, en esta tesis se ha llevado a cabo un análisis vibracional de estos compuestos mediante cálculo y asignación de los modos de vibración.

Los resultados teóricos y experimentales permitieron seguir la siguiente metodología en el tratamiento vibracional de estos compuestos:

1. Obtención de los espectros de vibración (IR y Raman) de las sustancias objetivo, y asignación de bandas asistida por cálculos teóricos.
2. Aplicación de la espectroscopía SERS para analitos de adsorción espontánea sobre los metales y deducción de la adsorción en diversos coloides metálicos y a diferentes condiciones de pH, investigándose el mecanismo de interacción entre la molécula y el metal para determinar las condiciones óptimas de análisis.
3. En el caso de moléculas sin ninguna afinidad por los metales, funcionalización del metal para estimular la aproximación de las mismas a la superficie.

De esta forma, se obtuvieron las condiciones óptimas de detección específicas de cada molécula. La estructura de la presente sección se basa en esta metodología, de tal forma que se exponen los resultados de cada paso para todas las moléculas estudiadas. La interpretación de los espectros vibracionales y SERS proporciona la información cualitativa necesaria para la identificación de estas sustancias.

5.4.1. Espectros de vibración de Sustancias de Dopaje Deportivo

La asignación de las bandas de vibración de los compuestos puros es necesaria para la correcta interpretación de los espectros SERS, ya que se pretende extraer información estructural cualitativa con la finalidad de identificar las moléculas a partir de su espectro SERS. Por lo tanto, la obtención e interpretación de los espectros de vibración IR y Raman de los compuestos puros constituye un primer paso imprescindible para los objetivos del presente trabajo. Muchas de las moléculas estudiadas en esta tesis no habían sido estudiadas con anterioridad mediante técnicas de espectroscopía de vibración, por lo que ha sido necesario un trabajo previo de asignación de los espectros de vibración obtenidos.

Las tablas de las asignaciones de las principales bandas que aparecen en los espectros de absorción IR y Raman de los sólidos de los compuestos estudiados se muestran en el Anexo 2. La discusión que se presenta en esta sección está enfocada fundamentalmente sobre las bandas más importantes de los espectros SERS. Para la asignación de estas bandas se llevaron a cabo los cálculos mediante DFT de los modos de vibración teóricos que se compararon a continuación con los datos bibliográficos, recabados a partir de moléculas estructuralmente relacionadas.

A. Agonistas del receptor adrenérgico β_2 (β AA)

Las figuras 5.26 y 5.27 muestran los espectros de vibración de clenbuterol y salbutamol, junto con la asignación de las bandas más importantes. Las Tablas 9.1 y 9.2 del Anexo 2 muestran una asignación más detallada de estos espectros. Dicha asignación se efectuó a partir del estudio teórico de los modos de vibración por DFT que se completó con la información extraída de trabajos previos en la caracterización vibracional de otros β AA^[103, 104, 171] y beta bloqueantes^[171]. Los espectros IR y Raman de la terbutalina, en particular, fueron publicados anteriormente por Ali *et al.*^[103]

Los espectros de vibración de estos compuestos presentan varias características similares, debidas a los fragmentos moleculares que tienen en común. Así, la fracción aromática presenta, en el caso de CB y TB, bandas debidas a ν C=C del anillo aromático, las vibraciones características del grupo NH₂ anilínico, deformaciones de los grupos C-H aromáticos y tensiones C-Cl o C-OH. Por otro lado, los modos asociados a la parte alifática son fundamentalmente las vibraciones del grupo *tert*-butilo y las de los grupos

OH y NH de la cadena alifática, diferentes y distinguibles de los unidos a la fracción aromática. En general las vibraciones más polares aparecen con más intensidad en el espectro IR que en el Raman, y viceversa.

Clembuterol (CB)

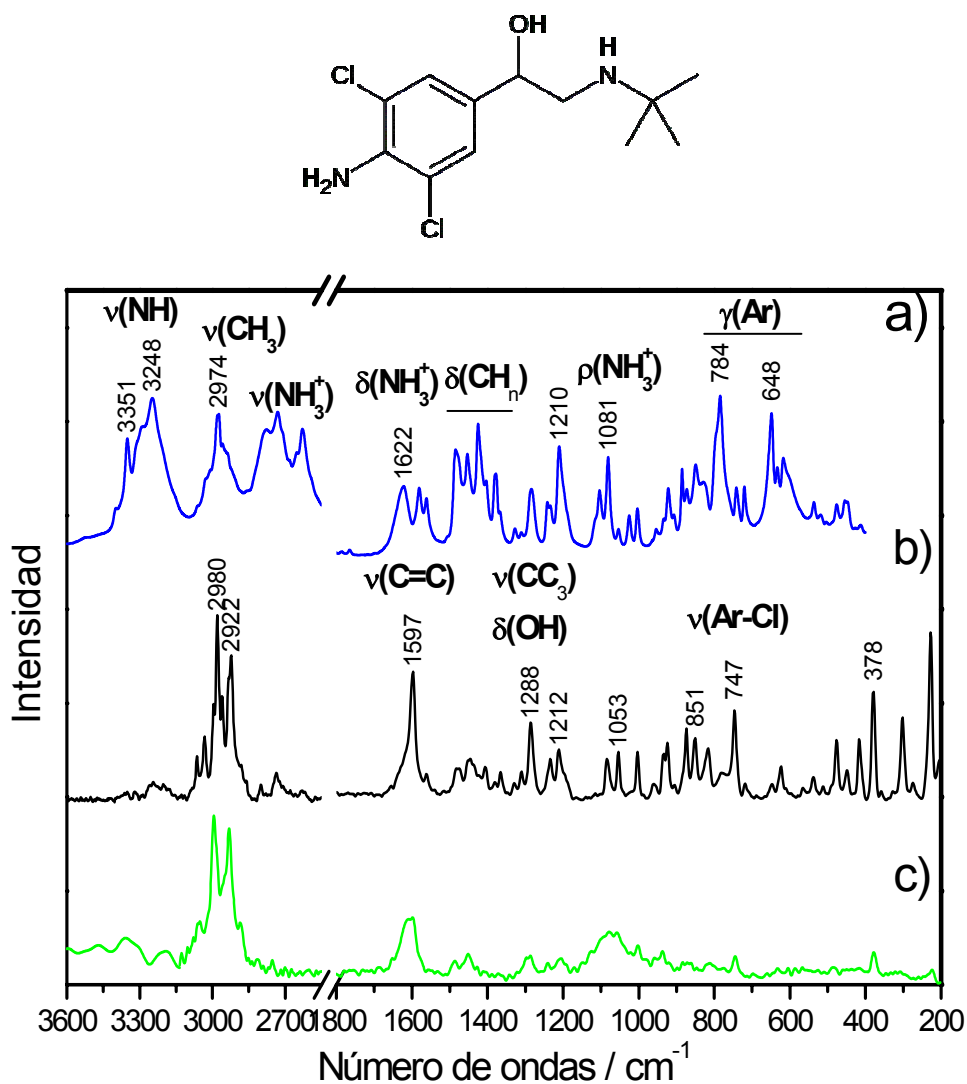


Figura 5.26. Fórmula estructural y espectros de vibración del clorhidrato de clembuterol: a) IR del sólido en KBr, b) Raman del sólido, c) Raman en disolución acuosa (0,1 M). $\lambda_{\text{exc}} = 1064 \text{ nm}$

Los espectros IR y Raman del CB se muestran en la Fig. 5.26. La zona de altas frecuencias ($3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$) del espectro IR está dominada por las bandas de las vibraciones νNH y νOH , más intensas que las νCH alifáticas a $2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ (Fig. 5.32a). Como puede observarse, esta relación de intensidades se invierte en el espectro Raman (5.26b). A frecuencias inferiores ($< 1800 \text{ cm}^{-1}$), las bandas más intensas en el

espectro IR corresponden a deformaciones del grupo NH_2 anilínico junto a las deformaciones de los metilos ($1480\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$), la banda a 1210 cm^{-1} , asignada a vibraciones $t(\text{CH}_2)/\delta(\text{OH})$ y la banda a 1081 cm^{-1} , asignada a vibraciones ρNH_2 . Por debajo de 1000 cm^{-1} aparecen bandas asociadas a vibraciones estructurales como la deformación fuera del plano del anillo aromático acoplada a $\nu\text{C-Cl}$, a 784 cm^{-1} , y la deformación fuera del plano a 648 cm^{-1} . Por otro lado, las bandas más intensas del espectro Raman son: la banda $\nu\text{C=C}$ del anillo aromático, centrada a 1597 cm^{-1} , la vibración estructural νCC_3 del grupo *tert*-butilo acoplada a $\delta(\text{OH})$, que aparece a 1288 cm^{-1} , el modo de respiración del anillo, a 1003 cm^{-1} , y la banda a 747 cm^{-1} que puede asignarse a $\nu\text{C-Cl}$ acoplada a $\nu_s\text{CC}_3$ del *tert*-butilo. El resto de bandas intensas en Raman por debajo de los 500 cm^{-1} se deben a vibraciones de esqueleto.

Salbutamol (SB)

Los espectros IR y Raman de SB se muestran en la Fig. 5.27 junto con las asignaciones de las bandas de mayor relevancia para el estudio SERS. La zona de altas frecuencias del espectro IR presenta una banda νNH intensa a 3316 cm^{-1} , una νOH ancha a 3183 cm^{-1} y las νCH alifáticas de los grupos metilo (2967 cm^{-1}) y metileno (2879 cm^{-1}). En la región de frecuencias más bajas se observan bandas intensas a 1506 cm^{-1} , asignada a la vibración δNH ; a 1219 cm^{-1} , asignada a $\nu\text{C-O}$ de los grupos fenol; a 1081 cm^{-1} , debida a $\nu\text{C-O}$ del alcohol secundario; y la banda ρCH_3 a 1040 cm^{-1} . Las bandas que aparecen a 1610 , $1456\text{-}1466$, 1270 y 1235 cm^{-1} son intensas tanto en el espectro Raman como en IR. Estas bandas pueden asignarse a $\nu\text{C=C}$ del anillo aromático, a δCH_2 , y a vibraciones del grupo *tert*-butilo acopladas con $\delta(\text{OH})$ las dos últimas bandas.

El espectro Raman de SB difiere del IR por la presencia de intensas bandas νCH del anillo bencénico a 3055 cm^{-1} , y de bandas νCH entre 2982 y 2833 cm^{-1} correspondientes a la parte alifática. También destaca una banda intensa a 776 cm^{-1} , que se atribuye a una deformación en el plano característica de esta molécula.

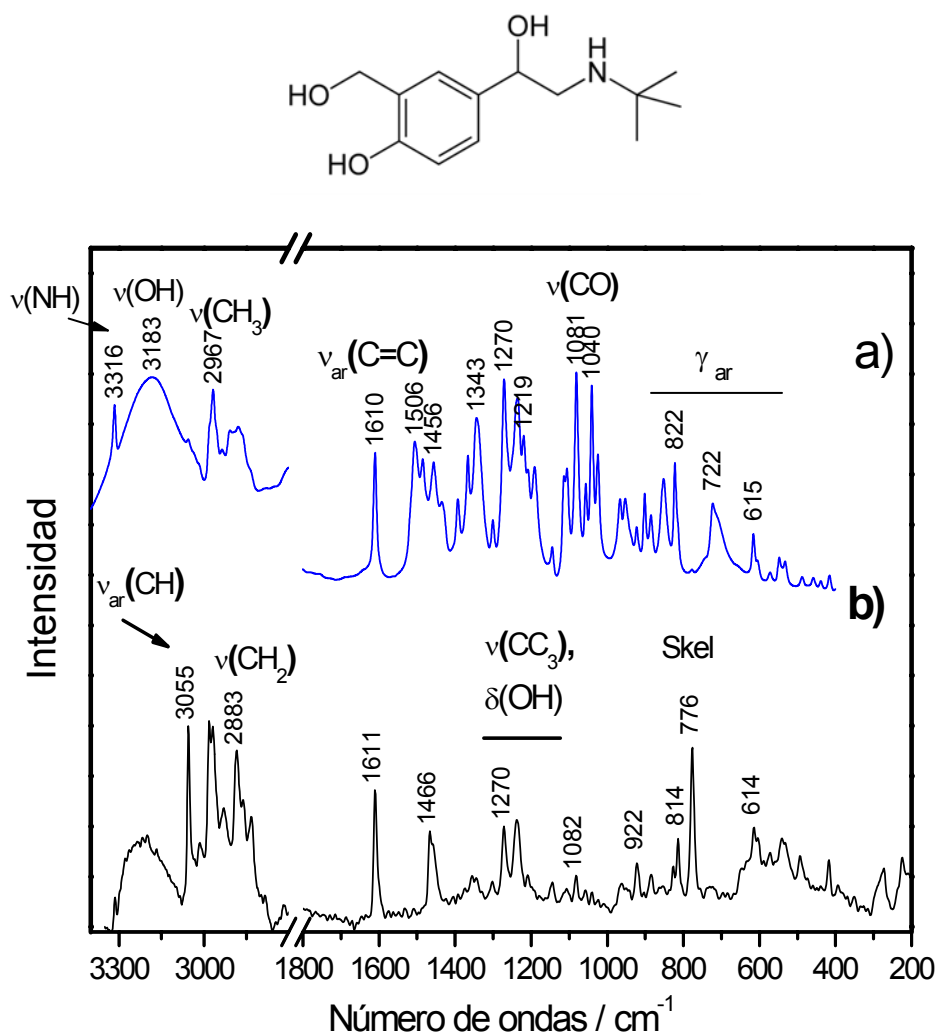


Figura 5.27. Fórmula estructural y espectros de vibración del salbutamol en estado sólido: a) IR en KBr, b) Raman con $\lambda_{\text{exc}} = 1064 \text{ nm}$

Terbutalina (TB)

El espectro Raman de la TB (no mostrado) muestra bandas muy intensas a 999 y 974 cm^{-1} , características de las vibraciones de respiración del anillo aromático en los grupos resorcinol^[172]. No se muestran los espectros IR y Raman de esta molécula, ni se discuten las asignaciones porque ya han sido publicadas.

B. *Aminoglutetimida (AGI)*

Los espectros IR y Raman de la AGI se muestran en la Fig. 5.28, las asignaciones puede consultarse en la Tabla 9.3 del Anexo 2. Los espectros de vibración de la AGI fueron estudiados anteriormente por Glice y col., combinando espectroscopía IR y Raman con cálculos *ab initio*^[107, 108]. Sin embargo, al tratarse de trabajos centrados principalmente en espectroscopía IR, dejan de lado la interpretación de algunas bandas

importantes que aparecen únicamente en Raman. Por consiguiente, fue necesario un examen más profundo del espectro Raman de esta molécula para la identificación del espectro SERS de esta molécula. Para ayudar a la asignación del espectro Raman se realizaron cálculos por DFT.

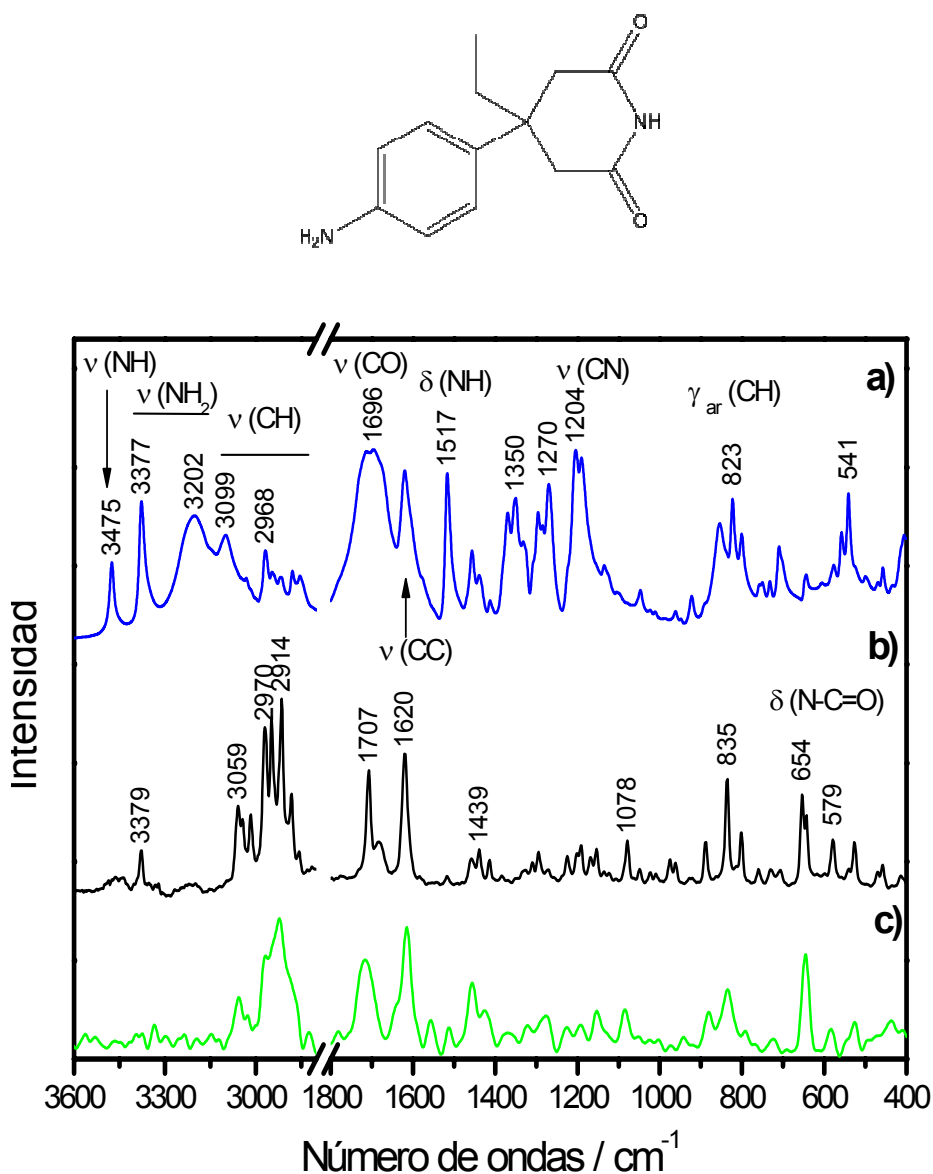


Figura 5.28. Fórmula estructural y espectros de vibración de la aminoglutarimida, a) IR del sólido en KBr, b) Raman del sólido, c) Raman en disolución etanólica (0,1 M). $\lambda_{\text{exc}} = 1064 \text{ nm}$

Las bandas más importantes del espectro IR son las correspondientes a los grupos funcionales imida y amino. Las vibraciones $\nu\text{N-H}$, C=O y C-N dan lugar a bandas intensas a $3500\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$, 1696 cm^{-1} y 1190 cm^{-1} . El ensanchamiento de la banda de νNH del grupo imida centrada a 3202 cm^{-1} en el espectro IR de la AGI sólida se

atribuye a enlaces de hidrógeno intermoleculares^[108]. También se observa una banda intensa en el espectro IR a 1517 cm^{-1} asignada a δNH .

Por otra parte, las bandas más intensas en el espectro Raman se deben a vibraciones del esqueleto carbonado de la molécula. De hecho, las vibraciones $\nu\text{C-H}$, $\text{C}=\text{C}$ y C-C dan lugar a bandas intensas en el espectro Raman que son fácilmente reconocibles en la región de $3100\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, a 1620 cm^{-1} y entre 1100 y 1000 cm^{-1} . La $\nu\text{C}=\text{O}$ del grupo amida da lugar a una banda de intensidad media a 1707 cm^{-1} .

La asignación de los espectros de vibración que se presenta en el Anexo 2, difiere en algunos aspectos de la realizada por Glice et al. Estos autores asignan la banda a 1620 cm^{-1} , intensa tanto en el espectro IR como en Raman, a la vibración δNH_2 . Si esto fuera así, se trataría de una banda débil en Raman y mostraría una alta susceptibilidad a los cambios en el pH. Como no se cumplen ambas condiciones y además es una banda que aparece de manera destacada en los espectros SERS, donde tiende a intensificarse las bandas de vibraciones de grupos aromáticos, ésta se ha asignado a vibraciones $\nu\text{C}=\text{C}$ del anillo aromático.

Por otra parte, la banda a 1517 cm^{-1} se ha asignado a una combinación de la νCN con la δNH de la imida (banda amida II), en lugar de a una vibración de δCH del anillo aromático como proponen Glice y col., puesto que estas deformaciones aparecen a frecuencias más bajas. Otra razón para proponer esta asignación es que la banda a 1517 cm^{-1} aparece a la frecuencia característica de las bandas amida II, tal como también indica el cálculo DFT (Anexo 2), lo que corrobora el hecho de que su intensidad sea muy superior en el espectro IR que en el Raman, como corresponde a enlaces con carácter polar.

C. Probenecid (PB)

Los espectros IR y Raman del probenecid se muestran en la figura 5.29. La asignación de las bandas de estos espectros se realizó en base a los cálculos por DFT junto con bibliografía general de asignación de bandas de vibración^[173]. Estas asignaciones se muestran en la Tabla 9.5 del Anexo 2.

El espectro IR está dominado por las bandas de los grupos más polares, es decir los grupos carboxílico y sulfonamida. La región de altas frecuencias ($> 2800\text{ cm}^{-1}$) presenta un fondo de absorción ancho debido a las vibraciones νOH del ácido carboxílico, que se encuentra formando enlaces de hidrógeno intermoleculares en estado sólido. Se

distinguen también las bandas νCH de las fracciones aromática y alifática. A frecuencias menores ($< 1800\text{ cm}^{-1}$) destacan las bandas correspondientes al grupo carboxílico, particularmente $\nu\text{C}=\text{O}$ a 1691 cm^{-1} y δOH a 1346 cm^{-1} ; y las bandas debidas al grupo SO_2 , como la banda $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$ a 1289 cm^{-1} y la banda a 1158 cm^{-1} , resultante de la combinación de $\delta_{\text{ip}}\text{CH}$ y $\delta_{\text{ip}}\text{OH}$ aromáticos. Las bandas δCH_2 ($1470\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$) y γOH (a 606 cm^{-1}) son de intensidad media tanto en IR como en Raman.

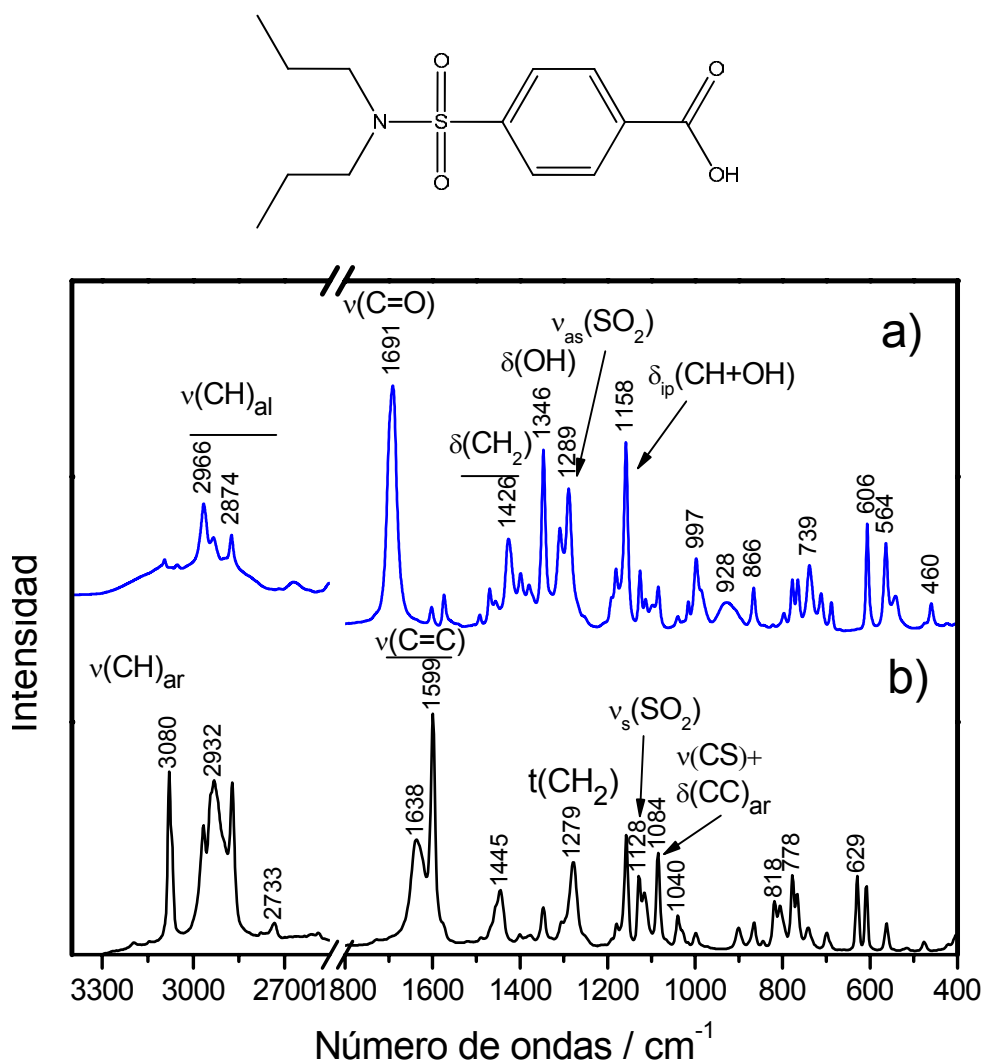


Figura 5.29. Fórmula estructural y espectros de vibración de probenecid: a) IR del sólido en KBr, b) Raman del sólido con $\lambda_{\text{exc}} = 1064\text{ nm}$.

En el espectro Raman, las bandas más importantes están relacionadas con el esqueleto hidrocarbonado y el grupo sulfonamida. A altas frecuencias, las bandas de tensión CH (3080 cm^{-1} los aromáticos; 2932 y 2872 cm^{-1} los alifáticos) son las más intensas. Por debajo de 1800 cm^{-1} , las bandas del grupo carboxilílico son muy débiles, y sobresalen dos bandas correspondientes a vibraciones $\nu\text{C}=\text{C}$ del anillo aromático a 1638

y 1599 cm^{-1} y la banda a 1279 cm^{-1} asignada a vibraciones νCH_2 de los grupos alifáticos. En relación al grupo sulfonamida, la banda asignada a $\nu_s(\text{SO}_2)$ del grupo SO_2 aparece a 1128 cm^{-1} , y la banda a 1084 cm^{-1} se asigna a una mezcla de $\nu\text{C-S}$ con una deformación del anillo aromático. Finalmente, las bandas que aparecen por debajo de 800 cm^{-1} son debidas a vibraciones de esqueleto.

D. Nandrolona (NR)

Para la asignación de los espectros de vibración de la NR se emplearon cálculos por DFT, así como datos bibliográficos de asignaciones de otros esteroides^[174, 175], resultando de especial utilidad la asignación de la testosterona por Szyzewski y col^[174] debido a la estrecha relación estructural entre estas dos moléculas. Sus espectros Raman e IR experimentales se muestran en la Figura 5.30.

La nandrolona es totalmente alifática y presenta como grupos funcionales un grupo carbonilo α -insaturado y un alcohol secundario, aparte del esqueleto hidrocarbonado formado por ciclos de 6 y 5 carbonos.

En la región de altas frecuencias del espectro IR, destacan las bandas νOH , con un máximo a 3422 cm^{-1} , y las vibraciones νCH de los grupos alifáticos en la región $2960\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$, que aparecen tanto en los espectros IR como Raman. Por otra parte, la vibración νCH de los grupos unidos al doble enlace $\text{C}=\text{C}$ se observa de manera más destacada en el espectro Raman a 3053 cm^{-1} .

Las vibraciones $\nu\text{C}=\text{O}$ y $\nu\text{C}=\text{C}$, al encontrarse conjugados los enlaces $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{C}$, aparecen en el espectro IR a dos frecuencias: en fase, a 1666 cm^{-1} , que es más intensa en el espectro IR, y la vibración fuera de fase, a 1651 cm^{-1} , que es más intensa en Raman. La banda Raman a 1620 cm^{-1} se asigna a una vibración pura del doble enlace $\text{C}=\text{C}$.

En la región $1490\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ aparecen varias bandas debidas a vibraciones $\delta(\text{CH}_2)$. Las bandas entre 1350 y 1320 cm^{-1} se asignan a vibraciones ωCH_2 . Las vibraciones νCH_2 aparecen entre 1280 y 1240 cm^{-1} , mientras que la banda observada a 1208 cm^{-1} se asigna a δOH . Por debajo de estas frecuencias se encuentran vibraciones de tensión $\nu\text{C-C}$ (las más importantes a 1155 y 1074 cm^{-1}), la $\nu\text{C-OH}$ a 1133 cm^{-1} y otras bandas de los grupos CH a 1052 y 1022 cm^{-1} .

Por último, la zona de bajas frecuencias ($< 1000 \text{ cm}^{-1}$) presenta más bandas en Raman, debido a las vibraciones de deformación de esqueleto y a vibraciones ρCH_2 .

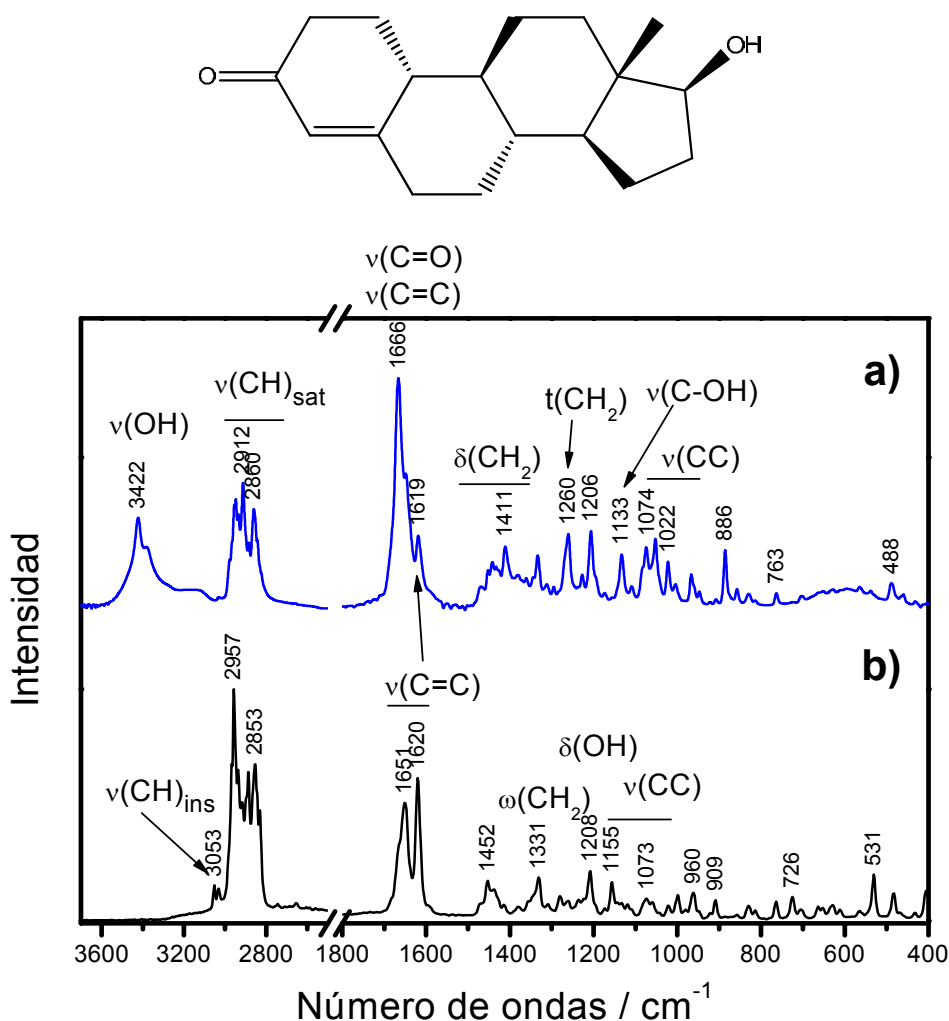


Figura 5.30. Fórmula estructural y espectros de vibración de nandrolona en estado sólido: a) IR en KBr, b) Raman con $\lambda_{\text{exc}} = 1064 \text{ nm}$

5.4.2. SERS de sustancias de dopaje deportivo que interactúan directamente con el metal

En esta sección se analizan los espectros SERS de SDD que interactúan directamente con NPs de Ag y de Au debido a que presentan en su estructura grupos funcionales que poseen cierta afinidad por estas superficies. La interpretación del espectro SERS de las moléculas que interactúan directamente constituye un paso previo para su posterior identificación y detección, así como para obtener información

sobre los procesos que ocurren en la interfase. Particularmente, la información derivada de los espectros SERS está relacionada con fenómenos como el mecanismo de interacción, la orientación molecular o el recubrimiento de la superficie, propiedades éstas que dependen de la molécula a estudiar.

El análisis de los espectros SERS se ha hecho por comparación con los espectros Raman en disolución o en estado sólido, empleando también los espectros teóricos resultantes de los cálculos mostrados en la sección anterior.

La detección de estas sustancias a nivel de trazas mediante SERS requiere de un proceso de optimización de las condiciones a las que se han de llevar a cabo las medidas SERS para obtener la máxima sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. Los espectros SERS se obtuvieron sobre NPs de Ag y de Au, por ser los soportes más activos, y en condiciones de SERS promediado para no limitar la reproducibilidad. Con estos sustratos se ha llevado a cabo una investigación del efecto de una serie de variables experimentales de medida para determinar las condiciones óptimas de la detección. Las variables analizadas han sido: el metal (Ag ó Au), el método de fabricación y la morfología de las nanopartículas empleadas como soporte, el pH del medio, la concentración y la presencia de otras especies presentes en la interfase (relacionadas con el método de fabricación de las NPs). Una vez realizado este estudio pueden ser determinadas las condiciones óptimas para llevar a cabo la detección de cada uno de los compuestos analizados.

Finalmente, de este análisis se obtuvo información relevante sobre la adsorción de cada una de las sustancias estudiadas, como el mecanismo de interacción con la superficie y la orientación que el adsorbato adopta sobre la misma.

A. Agonistas del receptor adrenérgico β_2 ($AA\beta$)

El salbutamol y la terbutalina (SB y TB) no muestran ningún tipo de actividad SERS sobre NPs de Ag de los coloides AgCT, AgHX y AgBH, lo que indica la falta de afinidad por estas superficies. Por otra parte, el clenbuterol (CB) da lugar a un espectro SERS sin ninguna correspondencia con las bandas características de la sustancia en disolución o estado sólido, lo que sugiere que en este caso la interacción es tan fuerte que esta molécula sufre cambios estructurales debido a una posible catálisis inducida por el metal (este espectro se muestra en el Anexo 3). Sin embargo, el coloide AuCT resultó ser apropiado para estas sustancias, por lo que se usó como sustrato SERS para

llevar a cabo la detección de los A β sin necesidad de recurrir a funcionalización de las nanopartículas. La detección de A β se pudo realizar de manera selectiva, por lo tanto, sobre NPs de Au. A continuación se expone la interpretación de los espectros SERS obtenidos a partir de estas sustancias sobre Au.

Clembuterol

Los espectros SERS del CB (Fig. 5.31) muestran un perfil diferente al variar el pH. A pH ácido (Fig. 5.31a, b y c), las bandas correspondientes a la parte aromática son las más intensas en el espectro SERS. Por ejemplo, la banda ν C=C del anillo aromático, que aparece levemente desplazada a frecuencias más alta (1601 cm^{-1}) y también la banda a 1259 cm^{-1} , atribuida a vibraciones ν C-N en el anillo anilínico acoplada a deformaciones en el plano del anillo son intensificadas a pH ácido. Asimismo, estas bandas aparecen desplazadas respecto a las correspondientes bandas en el Raman del sólido (Fig. 5.31h). Otras bandas del anillo que aumentan de intensidad son la banda a 1472 cm^{-1} , asignada a tensiones en el plano del anillo acopladas a vibraciones δ NH₂, así como la banda intensa a 385 cm^{-1} debida a deformaciones en el plano del anillo bencénico acopladas a vibraciones δ C-C-Cl^[176].

Al aumentar el pH a 7.0, el perfil del espectro cambia (Figura 5.31d-g). Así, la intensidad de las bandas a 1601 , 1472 y 1259 cm^{-1} disminuye drásticamente, mientras que la intensidad de un grupo de bandas atribuidas a la parte alifática aumenta. Este es el caso de la banda a 1240 cm^{-1} , asignada a las vibraciones ν _sCC₃, δ OH y tCH₂, de la cadena alifática. También se intensifica a alto pH el grupo de bandas que aparece en la región 1100 - 1000 cm^{-1} , atribuidas a vibraciones ν C-C del esqueleto alifático acopladas a vibraciones ρ (CH₃). A este pH, la banda más intensa se observa a 882 cm^{-1} , atribuida también a una vibración rocking de los grupos metilo del *tert*-butilo. Por último, la banda intensa a 375 cm^{-1} se atribuye a una deformación de esqueleto de la cadena alifática.

Por lo tanto, se puede deducir de estos espectros que la adsorción y el mecanismo de interacción del CB sobre las nanopartículas de oro varían en función del pH del medio, tal como se indica en la Figura 5.31. A pH bajo, la mayor intensificación de las bandas asociadas a vibraciones de la fracción anilínica sugiere que el CB queda adsorbido sobre el oro a través del grupo -NH₃⁺. Este grupo se encuentra protonado a pH ácido, por lo que se deduce que el mecanismo de interacción de este grupo con la

superficie tiene lugar electrostáticamente mediante la formación de pares iónicos con las especies aniónicas ya adsorbidas sobre la superficie del metal, es decir los iones cloruro y nitrato.

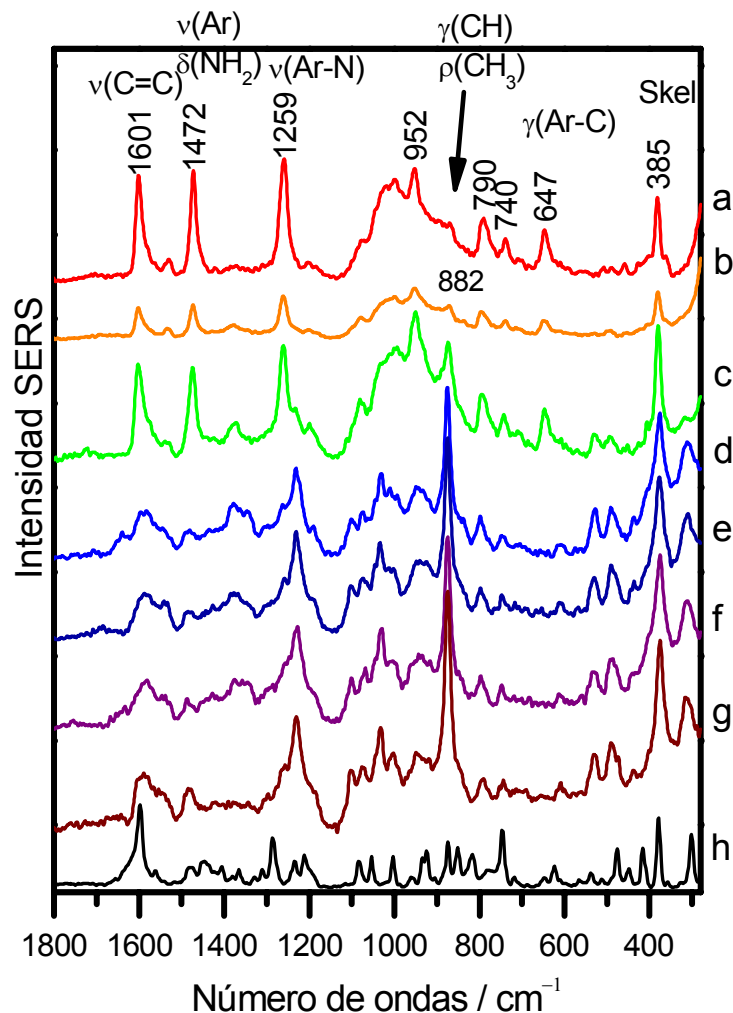


Figura 5.31. (a-g): Espectros SERS del clenbuterol (10^{-5} M) a los siguientes pH a) 3; b) 4; c) 5; d) 7; e) 8; f) 9.5; g) 11; h) Espectro Raman de clenbuterol en estado sólido. Excitación a 785 nm.

Sin embargo, a valores de pH por encima de 7.0 el mecanismo de adsorción del CB en oro cambia, al producirse la desprotonación de los dos grupos amino que existen en su estructura (tanto el alifático como el aromático). En estas condiciones, la interacción con el metal se produce a través del grupo amino secundario de la parte alifática, por formación de un enlace covalente dativo directamente con el metal. Este grupo tiene una tendencia superior a interactuar con metales que el grupo anilínico a pH alcalino, debido a su mayor basicidad. Así pues, esta interacción da lugar a una

mayor intensificación de las bandas características de la parte alifática por encontrarse más próximas a la superficie.

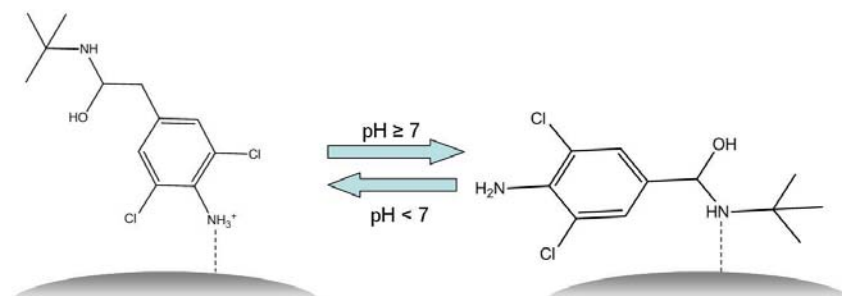


Figura 5.32. Esquema del mecanismo de interacción y la orientación deducidos para CB sobre NPs de Au.

Salbutamol

El SB presenta espectros SERS con una peor relación señal-ruido que los obtenidos para el CB (Fig. 5.33). Esta diferencia es aún más evidente a pH bajo (5.33d-f). Mientras que para el CB se observan bandas SERS más intensas a pH bajos, los espectros SERS del SB presentan una mayor intensidad a pH alcalino. Al igual que ocurre para CB, a un pH por encima de 7.0 las bandas más intensas corresponden a la fracción alifática de la molécula. Concretamente, se observa una intensificación de las bandas a 1230 y 880 cm^{-1} , que se corresponden con las equivalentes observadas para el CB. Este resultado sugiere que el SB se adsorbe sobre la superficie del metal a través de la amina alifática, mediante un mecanismo de interacción similar al deducido para el CB, es decir mediante un enlace de coordinación que implica el grupo amino alifático (Figura 5.33, arriba).

Los espectros SERS del SB y del CB se diferencian, por ejemplo en la aparición de bandas intensas en las regiones de $850\text{-}800$ y $650\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Éstas pueden ser asignadas a movimientos fuera del plano del anillo aromático, lo que indicaría que el anillo bencénico del SB podría encontrarse adoptando una orientación preferentemente paralela a la superficie. La baja intensidad de la señal SERS a pH ácido se atribuye a la menor basicidad de la fracción fenólica del SB en comparación con el grupo anilínico del CB. Esto tiene como consecuencia que la interacción con el metal sea menor a pH bajo.

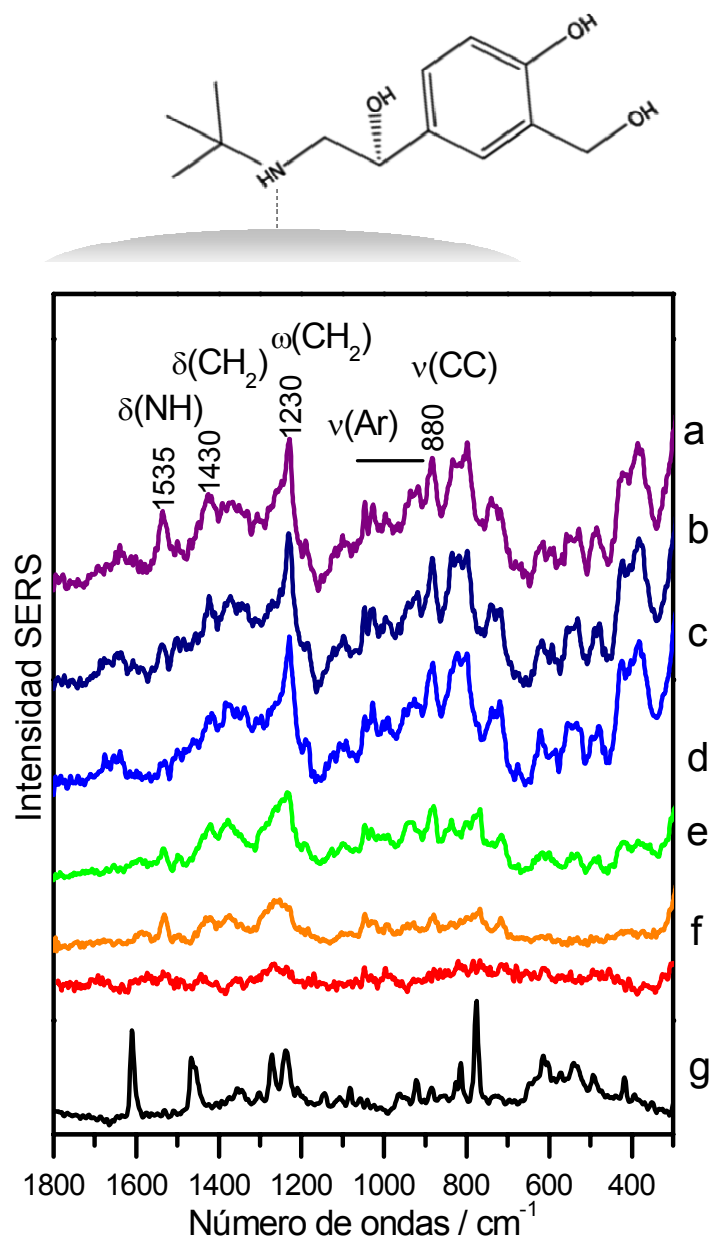


Figura 5.33. (a-e): Espectros SERS del SB (10^{-5} M) registrados a los siguientes pH: a) 11; b) 8; c) 7; d) 5; e) 4; f) 3; g) Espectro Raman del salbutamol en estado sólido. Arriba: Esquema de la adsorción de SB deducida a partir de los espectros. Excitación a 785 nm.

Terbutalina

Los espectros SERS y Raman de la TB en función del pH se muestran en la Fig. 5.34.

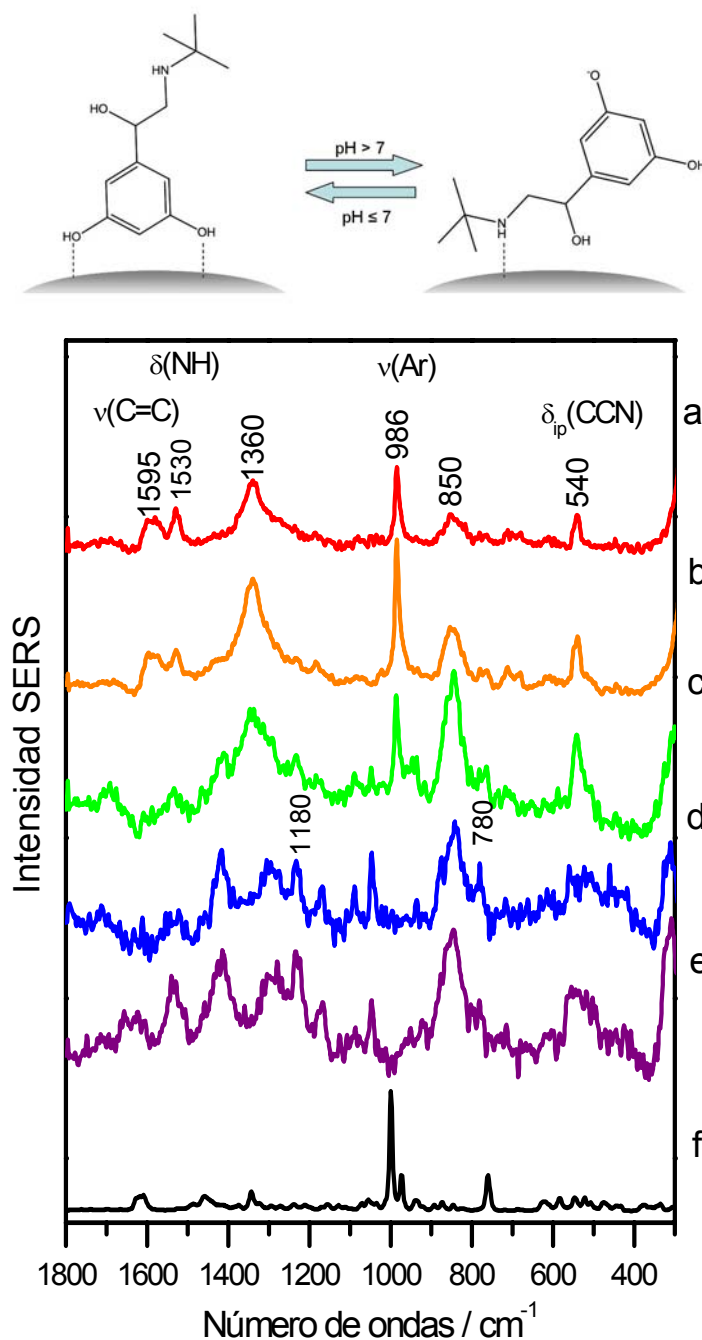


Figura 5.34. Espectros SERS de terbutalina (10^{-5} M) a los siguientes pH: a) 3.3, b) 4.0, c) 5.0, d) 7.5, e) 11.0. f) Espectro Raman del hemisulfato de terbutalina en estado sólido. *Arriba:* Esquema del mecanismo de interacción y orientación deducida de TB sobre Au deducida de los espectros en función del pH. Excitación a 785 nm.

A pH ácido, aparecen bandas asociadas al anillo benzénico, que presenta estructura resorcinol en TB. Es el caso de la banda a 1595 cm^{-1} , asignada al modo $\nu\text{C}=\text{C}$ del anillo, y a 985 cm^{-1} , debida al modo de respiración del mismo. Estas bandas indican una clara proximidad entre el grupo resorcinol y la superficie. El análisis de los espectros SERS permite deducir una interacción de TB con el metal mediante los grupos $-\text{OH}_2^+$

protonados del resorcinol, debido a la elevada basicidad relativa de este grupo^[172]. Sin embargo, a un pH alcalino se produce la intensificación de bandas correspondientes a vibraciones de la parte alifática en el espectro SERS. Por ejemplo, la vibración δNH a 1530 cm^{-1} , la vibración $\nu\text{C-O}$ del alcohol secundario a 1180 cm^{-1} , y las vibraciones ρCH_3 a 780 cm^{-1} . La banda ancha centrada a 1360 cm^{-1} puede asignarse a una combinación de modos (δCH_3 , νCN , y vibraciones del citrato residual). Por otro lado, la banda ancha que se observa a 850 cm^{-1} , se debe a los contraiones sulfato presentes en la muestra. Por lo tanto, la TB presenta un comportamiento similar al del CB, produciéndose una reorientación de la molécula sobre la superficie. Mientras que a pH ácido la parte aromática se ve más intensificada debido a la relativa basicidad de la misma, a pH alcalino la interacción tiene lugar mediante coordinación directa del grupo amino alifático con el Au (Figura 5.34, arriba).

Podemos deducir a partir de estos resultados que las intensidades netas de los espectros SERS a diferentes valores de pH están directamente relacionadas con la afinidad de cada molécula por la superficie de las NPs de oro. Así pues, el SB parece presentar una mayor afinidad por la superficie de oro en condiciones neutras o básicas, ya que en estos casos el espectro SERS es más intenso. Sin embargo, CB y TB se adsorben a cualquier pH sobre Au, siendo el espectro SERS más intenso a pH ácido, debido a que a este pH se favorece su adsorción a través de la parte aromática, que normalmente da lugar a mayores intensificaciones SERS.

B. Aminoglutetimida

A diferencia de los AA β , la AGI presenta actividad SERS tanto sobre NPs de Ag como de Au. Esta característica permitió realizar para esta molécula un estudio exhaustivo de su afinidad y mecanismo de interacción con sustratos metálicos de diferente naturaleza. Gracias a esto, se ha podido llevar a cabo una comparación de diferentes sistemas nanoestructurados basada en el empleo de un compuesto con un interés analítico evidente, en lugar de emplear para este fin moléculas como la rodamina 6G o el tiofenol, tal como ha sido realizado por otros autores^[177, 178], ya que estas moléculas presentan una afinidad mucho mayor por las superficies metálicas y una mayor sección eficaz Raman.

Concretamente, se estudió la adsorción de AGI sobre los coloides AuCT, AgCT, AgHX, AgBH y AgNPT. Con ello se investigó la influencia de los siguientes factores

en los mecanismos de adsorción, la orientación sobre la superficie y la intensificación de la señal Raman: a) la naturaleza del metal (Au frente a Ag); b) la morfología de las NPs (esférica frente a nanoprismas); c) la naturaleza química de la interfase (en términos de carga eléctrica y presencia de iones residuales); d) el pH del medio; y, por último, e) la concentración y, por ende, el recubrimiento de la interfase.

Este tipo de estudio se ha llevado a cabo en el caso de AGI porque esta molécula presenta dos posibles puntos de unión con los que puede interaccionar fuertemente con la superficie metálica: el grupo anilina (AN) y la glutarimida (GI) (Figura 5.35), que interaccionan con la superficie mediante mecanismos diferentes. En particular, los grupos amino e imido pueden interaccionar con el metal mediante interacción electrostática, con formación de pares iónicos con especies negativas existentes en la superficie, o mediante enlaces de coordinación. Asimismo, la carga eléctrica de la interfase y la de la propia AGI serán factores determinantes de los mecanismos de interacción metal-AGI que tendrán que ser tenidos en cuenta en la detección de esta molécula por NPs.

Para llevar a cabo este estudio se ha realizado el análisis teórico previo de los modos vibracionales de AGI presentado anteriormente (sección 5.4.1, Tabla 9.3 del Anexo 2) que ha permitido establecer una clara separación de las vibraciones de las fracciones AN y GI.

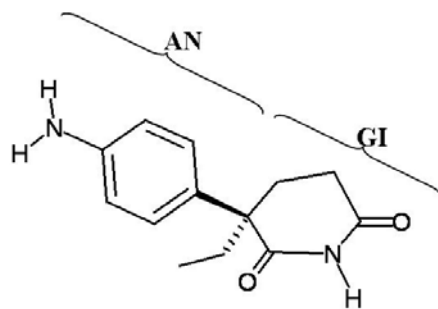


Figura 5.35. Estructura de la AGI en la que se distinguen sus dos partes estructurales principales: la anilina (AN) y glutarimida (GI).

Influencia del sustrato metálico

Los espectros SERS de AGI se han obtenido sobre diferentes coloides a las mismas condiciones de pH (6.0) y de concentración (10^{-4} M). Estos espectros se muestran en la Figura 5.36 normalizados a la banda del agua y comparados con el espectro Raman de la disolución en etanol.

Se observa que la intensidad relativa de las bandas correspondientes a los grupos AN y GI varía dependiendo del sustrato en que se adsorba la molécula y de la naturaleza del metal.

Al comparar los espectros SERS con el Raman en etanol (Figura 5.36f) se observa una gran disminución de la banda $\nu\text{C=O}$ a 1714 cm^{-1} (ver asignaciones en la Tabla 9.4 del Anexo 2), lo que indica que la interacción a través del grupo imida siempre tiene lugar. Asimismo, a consecuencia de esta interacción, la banda de $\delta\text{N-H}$ del grupo imida prácticamente desaparece en Ag, mientras que en Au aún se aprecia, a 1509 cm^{-1} .

El SERS sobre NPs de Au muestra una serie de bandas intensas a 1606, 1233, 1189 1076 y 647 cm^{-1} , asignadas a $\nu\text{C=C}$, $\delta\text{C-H}$, ρNH_2 , y δCCN correspondientes al grupo AN, que indican una interacción con el metal a través del grupo amino anilínico. Sin embargo, los espectros registrados en coloides de Ag presentan una contribución más importante de bandas del grupo GI, disminuyendo la intensidad de las bandas anilínicas a 1239 y 647 cm^{-1} . Esta diferencia revela la gran importancia que el metal tiene sobre el mecanismo de interacción del adsorbato sobre la superficie.

En coloides de plata, por otro lado, el mecanismo de interacción depende del tipo de sustrato. Así, las bandas de la fracción GI son más intensas en el coloide de AgCT, en el que se observan las bandas a 1702 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), 1302 (tCH_2), 835 y 801 cm^{-1} (ρCH_2), que en AgHX o AgNPT. Estas diferencias se atribuyen a los distintos métodos de preparación de cada coloide y pueden ser asignadas a las distintas interfases existentes en cada uno de estos sustratos. Así por ejemplo, la gran cantidad de iones citrato adsorbidos en la superficie del AgCT determina la presencia de bandas intensas de este ión (marcadas con asteriscos en la Fig. 5.36a). Igualmente, en los coloides de AgHX y AgNPT pueden observarse bandas intensas correspondientes a $\nu\text{Ag-Cl}$ y $\nu\text{Ag-Br}$, respectivamente. La presencia de Br^- en los AgNPT parece desplazar los iones citrato y borato también presentes en el medio como productos de oxidación en la formación de coloides AgCT y AgBH. Por lo tanto, la composición de la interfase parece tener una influencia importante en el mecanismo de adsorción de la AGI. Estas características van a determinar el factor de intensificación (EF) SERS de cada sustrato.

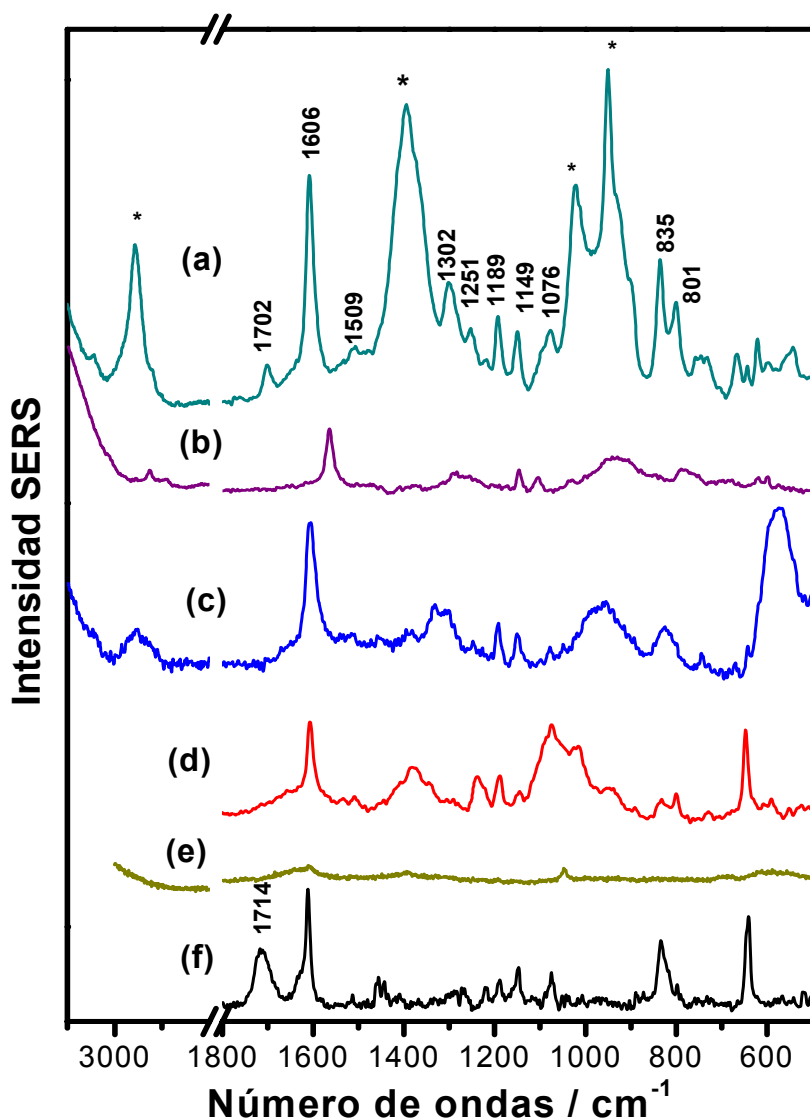


Figura 5.36. Espectros SERS de la AGI a pH 6.0 en los siguientes sustratos y concentraciones: a) AgCT ($[AGI]=10^{-6}$ M) (los asteriscos indican bandas del citrato); b) AgNPT ($[AGI]=10^{-6}$ M); c) AgHX ($[AGI]=10^{-4}$ M); d) AuCT ($[AGI]=10^{-4}$ M) y e) AgBH ($[AGI]=10^{-4}$ M); (e) Raman de la AGI en etanol (0.5 M). Excitación a 632.8 nm.

En la Tabla 5.5 se recogen los EF calculados para los distintos sustratos estudiados junto con otras características de los coloides obtenidos, como las dimensiones de las NPs, el número de NPs por mL y la superficie total de adsorción (STA). El valor más alto de EF se encontró para el coloide de AgNPT, lo que se asocia a la morfología de estas NPs, particularmente activas en la intensificación SERS. El potencial intensificador se puede evaluar más apropiadamente si se obtiene la intensificación por unidad de superficie, es decir EF/STA (Tabla 5.5), ya que tiene en cuenta la superficie disponible en cada soporte. Los coloides de AgCT y AuCT dan lugar a intensificaciones de magnitud similar, aunque superiores a las obtenidas usando

AgHX, lo que probablemente es debido a la mayor carga negativa existente en las partículas cubiertas por iones citrato, que parece atraer a la especie cargada de la AGI a pH 6. Por último, la intensidad SERS en el coloide AgBH resultó ser muy baja, lo que se asocia al pequeño tamaño de las NPs que lo integran.

Tabla 5.5. Características de las NP metálicas fabricadas y factores de intensificación deducidos a partir de los espectros SERS registrados a pH=6.0.

Substrato	Tamaño NP/nm*	Nº de NP/mL	STA cm ² /mL	EF	EF/STA
AgCT	D=50±5	1.56*10 ¹¹	12.3 ± 2.5	1.01*10 ⁶	8.2*10 ⁴
AgHX	D=45±4	2.14*10 ¹¹	13.6 ± 2.6	3.5*10 ³	2.6*10 ²
AgBH	D= 15 ± 2	2.30*10 ¹³	16.4 ± 3.5	2.5*10 ²	18.7
AgNPT	L=36±4 E=6.6±0.6	3.10*10 ¹¹	5.70 ± 1.2	7*10 ⁶	1.16*10 ⁶
AuCT	D= 20 ± 3	7.30*10 ¹¹	9.17 ± 3.0	9*10 ⁵	9.8*10 ⁴

*D=diámetro de la esfera, L=lado del triángulo, E=espesor de los nanoprismas.

Efecto del pH

El pH de la suspensión es también un factor que influye en el mecanismo de interacción de la AGI con las nanopartículas metálicas, como se ha visto para los AAβ, ya que la carga eléctrica de la molécula puede ser distinta al variar el pH. Este efecto se ha investigado tanto sobre NPs de Au como de Ag.

Los espectros SERS a diferentes pH de la AGI en el coloide AuCT se muestran en la Fig. 5.37.

A pH ácido, el espectro SERS de AGI se encuentra dominado por bandas intensas a 1606, 1233, 1189 y 647 cm⁻¹, debidas a la parte anilínica de la AGI (ver Tabla 9.4 en los anexos). Estas bandas pueden asignarse a las vibraciones νC=C (1606 cm⁻¹), δC-H (1233 y 1189 cm⁻¹) y a una vibración en el plano acoplada a δNH₂ (647 cm⁻¹) del anillo de anilina^[179, 180]. Por el contrario, las bandas correspondientes a la parte alifática de la AGI se debilitan en relación con las de la parte anilínica. Por ejemplo, las bandas del grupo imida son más débiles a pH ácido. Así, la banda amida II, debida a la vibración δN-H, aparece levemente desplazada hasta 1509 cm⁻¹ y con una menor intensidad. La banda intensa que se observa a 1076 cm⁻¹ se asigna a vibraciones δC-H en el plano del anillo acopladas a ρNH₂, en concordancia con la literatura^[180].

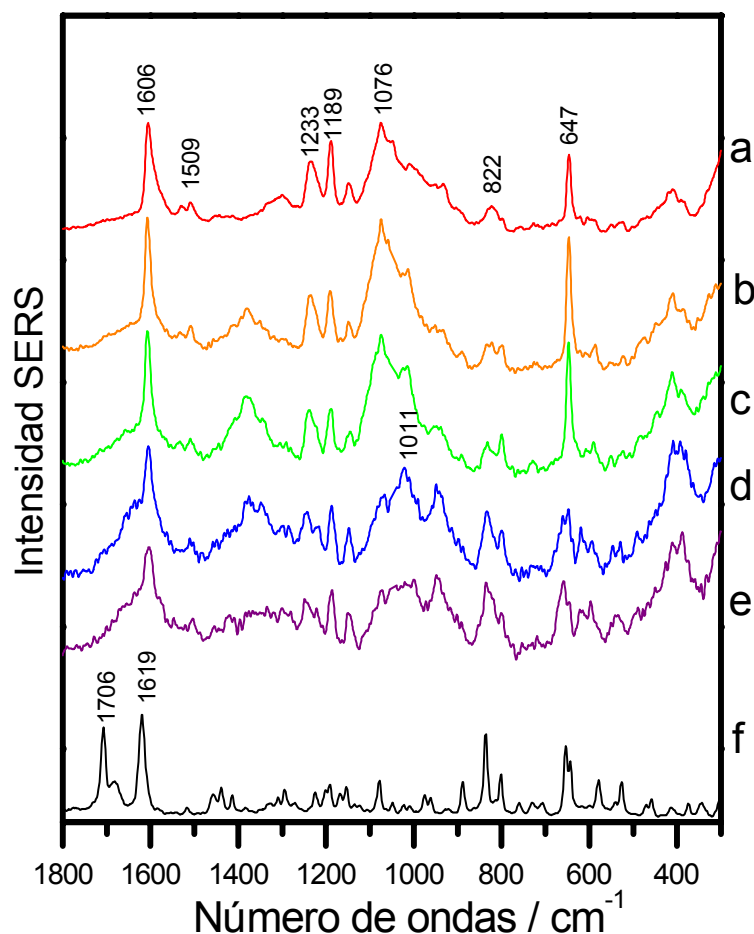


Figura 5.37. Espectros SERS de la AGI en AuCT a los siguientes valores de pH: a) 2.5, b) 4, c) 5, d) 7, e) 11; f) Espectro Raman de la AGI sólida

La mayor intensidad de las bandas de la parte anilínica se atribuye a que a pH ácido, el grupo amino del anillo anilínico se encuentra protonado, y puede interaccionar electrostáticamente con las especies aniónicas adsorbidas sobre la superficie metálica mediante la formación de un par iónico. Este mecanismo es similar a la adsorción descrita para clembuterol a pH ácido, que se produce también a través de la fracción anilínica con formación de pares iónicos sobre la superficie (Fig. 5.44).

A pH superior o igual a 7.0 se observa un cambio en el perfil de los espectros SERS de AGI con intensificación de bandas atribuidas a la parte alifática. Esto ocurre, por ejemplo, con una serie de bandas por debajo de 1000 cm^{-1} , correspondiente a vibraciones de esqueleto de la parte alifática, así como vibraciones $\rho(\text{CH}_2)$ y $\rho(\text{CH}_3)$ ^[181, 182]. Igualmente, se observan otras bandas debidas a los grupos alifáticos a 947, 1011, 1150, 1377 y 1421 cm^{-1} , correspondientes a $\nu(\text{C-C})$, $\rho(\text{CH}_2)$, $t(\text{CH}_2)$, y $\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$ respectivamente, que también se observan en moléculas con una estructura similar al

grupo GI^[183, 184]. Todas estas bandas aparecen también en el espectro Raman, aunque con una intensidad relativa muy inferior. Por lo tanto, a pH neutro o alcalino se deduce una interacción de AGI con la superficie de Au a través del grupo imida del GI.

Así pues, se deduce que la adsorción de la AGI sobre nanopartículas de oro sufre un cambio evidente dependiendo del pH del medio, que determinará su mecanismo de interacción con la superficie. Este cambio se encuentra modulado por la protonación del grupo anilínico: mientras a valores bajos de pH el mecanismo de interacción con el oro parece tener lugar a través del grupo anilínico protonado NH_3^+ (Fig. 5.38), a pH altos la interacción se produce a través del grupo imida situado en la parte alifática.

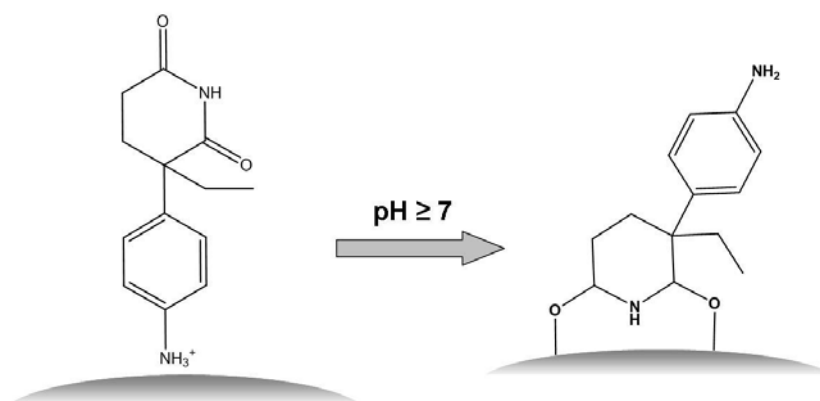


Figura 5.38. Esquema que muestra el mecanismo de adsorción propuesto en AuNPs

El efecto del pH se investigó también sobre los coloides de plata AgCT y AgNPT. De entre los coloides que contienen nanopartículas esféricas, se empleó el coloide de AgCT por ser el que da lugar a un mayor valor de EF. Los espectros SERS sobre estos sustratos a diferente pH se muestran en la figura 5.39, normalizados a la banda del agua. A diferencia de lo que ocurre en AuCT, se observa que en las superficies de plata la AGI no da lugar a un espectro SERS a pH por debajo de 6.0, lo que indica que la adsorción sobre Ag no está favorecida cuando la AGI se encuentra protonada. Para que se produzca la interacción de AGI con Ag es necesario que la molécula sea eléctricamente neutra. Sin embargo, adsorbatos de carácter ácido como el citrato tienden a interaccionar a pH ácido. Por este motivo, a pH por debajo de 7.0 se observa una notable intensificación de las bandas de citrato existente en la suspensión, como residuo de la fabricación del coloide.

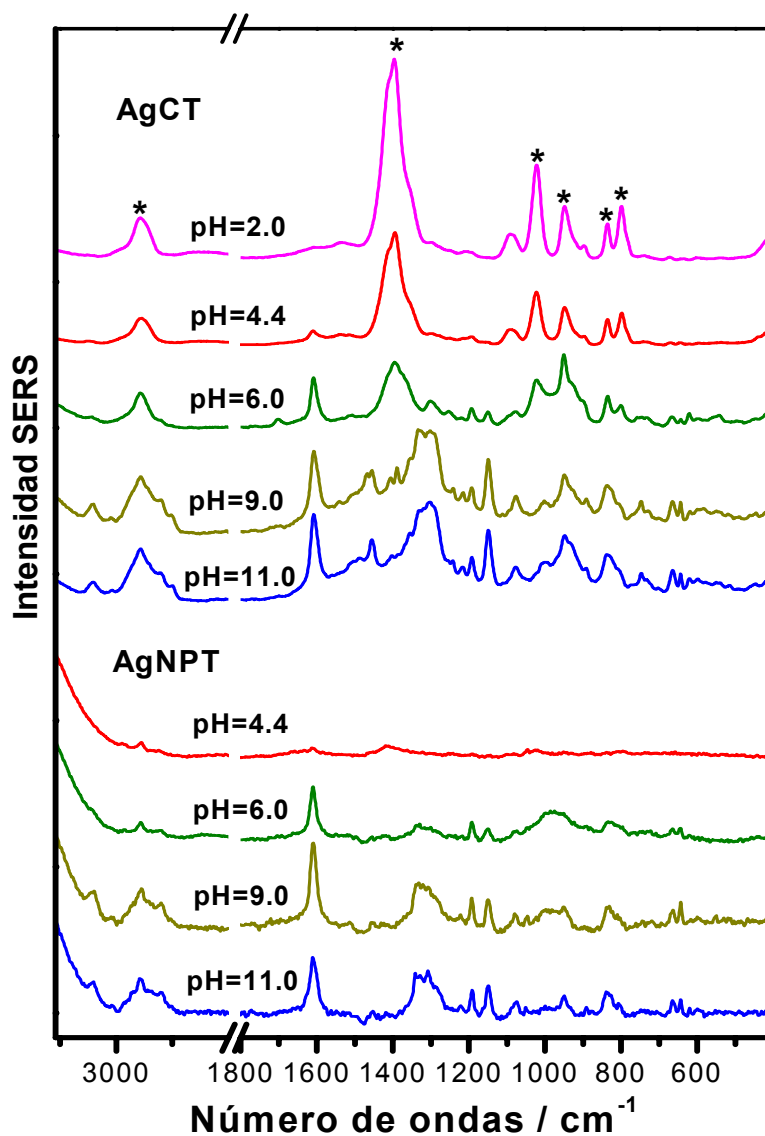


Figura 5.39. Espectros SERS de la AGI (10^{-4} M) en AgCT a pH 2.0, 4.4, 6.0, 9.0 y 11.0, y en AgNPT pH 4.4, 6.0, 9.0, 11.0.

Para seguir en más detalle la dependencia de la intensidad de los espectros con el pH se ha representado la intensidad de la banda más intensa (a 1606 cm^{-1}) a diferente pH (Figura 5.40) para los coloides estudiados: AgCT y AgNPT. Esta variación sigue un hábito sigmoidal (curva azul) similar al que permitió el cálculo del pK_a de esta molécula por resonancia de plasmón superficial (sección 5.3.1).

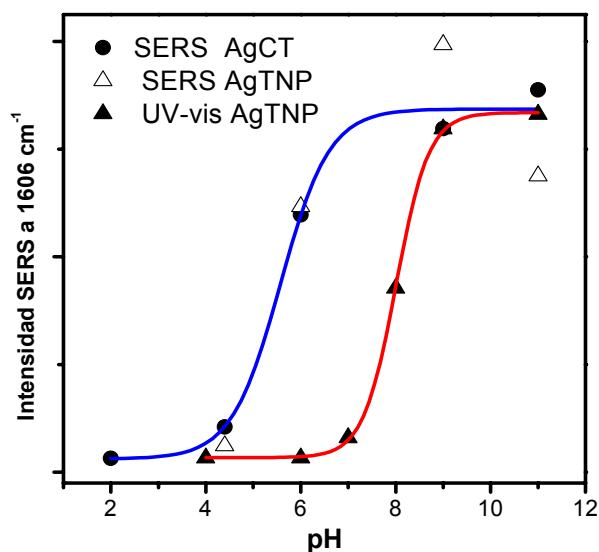


Figura 5.40. Variación de la intensidad de la banda a 1606 cm^{-1} para ambos coloides, normalizadas a su valor máximo.

En la Figura 5.40 también se representa la variación del máximo del plasmón a 702 nm (curva roja). Se observa un desplazamiento entre las curvas Plasmón/pH y SERS/pH. Este desplazamiento está relacionado con la distinta sensibilidad de la intensidad SERS y de la resonancia de plasmón con el recubrimiento de la superficie de Ag por AGI de la que ya se habló en la sección 5.3.2. Es decir, a concentraciones en las que se tiene un recubrimiento sub-monocapa la intensidad SERS comienza a ser importante mientras que la extinción correspondiente al plasmón de los agregados es muy baja.

Por otro lado, también resulta interesante el cambio de perfil espectral del SERS de AGI en AgCT y AgNPT que se produce a un pH entorno a 9.0. Como puede observarse en la Figura 5.39, por encima de este valor, se intensifican las bandas correspondientes a la GI, a 2936 , 1454 , 1150 , 837 y 663 cm^{-1} (Tabla 9.4 del Anexo 2) en relación con las bandas de la AN, como la banda a 1606 cm^{-1} . La dependencia del espectro SERS con la carga del grupo NH_2 y la ausencia de la banda $\nu\text{C}=\text{O}$ indican que a pH entre 7.0 y 9.0 se produce una interacción a través de los grupos AN o GI de manera simultánea, mientras que a $\text{pH} > 9.0$ la interacción a través del grupo GI cobra importancia. Los cambios observados a partir de un pH 9.0 pueden atribuirse a diferentes razones: a) desprotonación del NH de la imida, dando lugar a una interacción más fuerte a través del N de la misma, o b) reorientación de la molécula inducida por la variación de concentración. La desprotonación del grupo imida de la glutarimida ocurre

a pH 11.8^[185], pero este pK podría ser mucho más bajo en presencia de Ag, debido a la formación del complejo Ag-GI^[182]. La ausencia de las bandas C=O a todos los valores de pH sugiere que la desprotonación ya ocurre a valores de pH inferiores a 9.0. Por lo tanto, la única explicación plausible para estos cambios es la reorientación. En el coloide de AgNPT se observa una dependencia SERS/pH similar, aunque el aumento de las bandas de la GI es menor (Figura 5.45, AgNPT, pH 11). Como el aumento del pH lleva implícito un aumento de la concentración de la forma neutra AGI, que es la forma que se adsorbe activamente sobre la superficie, el estudio del pH sugiere un estudio del efecto de la concentración de AGI sobre la adsorción de esta molécula en la superficie de Ag.

Efecto del recubrimiento de la superficie

En la Fig. 5.41 se muestran los espectros SERS de la AGI en AgCT a pH 9.0, y a concentraciones crecientes del adsorbato. Estos espectros presentan dos perfiles diferentes que sufren una transición en el intervalo 1-3 μM de AGI. Por debajo de este valor, la adsorción parece darse mediante una interacción simultánea de los grupos AN y GI, como se ha visto con el efecto del pH, pero a concentraciones superiores la intensidad relativa de las bandas del grupo GI se hace más importante, como se deduce de la intensificación relativa de las bandas atribuidas a esta parte de la molécula (2936 cm^{-1} , debida a $\nu\text{C-H}$; 1454 cm^{-1} , atribuida a δCH_2 y δCH_3 ; 947 cm^{-1} , dada por tensiones $\nu\text{C-C}$; 837 y 663 cm^{-1} , atribuidas a deformaciones en el grupo GI). Estos resultados sugieren que, cuando el recubrimiento de la superficie es bajo, la adsorción se produce mediante un mecanismo bidentado (B) a través de establecimiento de enlaces de coordinación de los átomos de N de los grupos anilínico (AN) e imídico (GI) de la molécula de AGI neutra con la superficie de plata (Figura 5.42), mientras que al aumentar el recubrimiento se favorece la interacción de AGI a través del grupo GI mediante un mecanismo de unión monodentado (M).

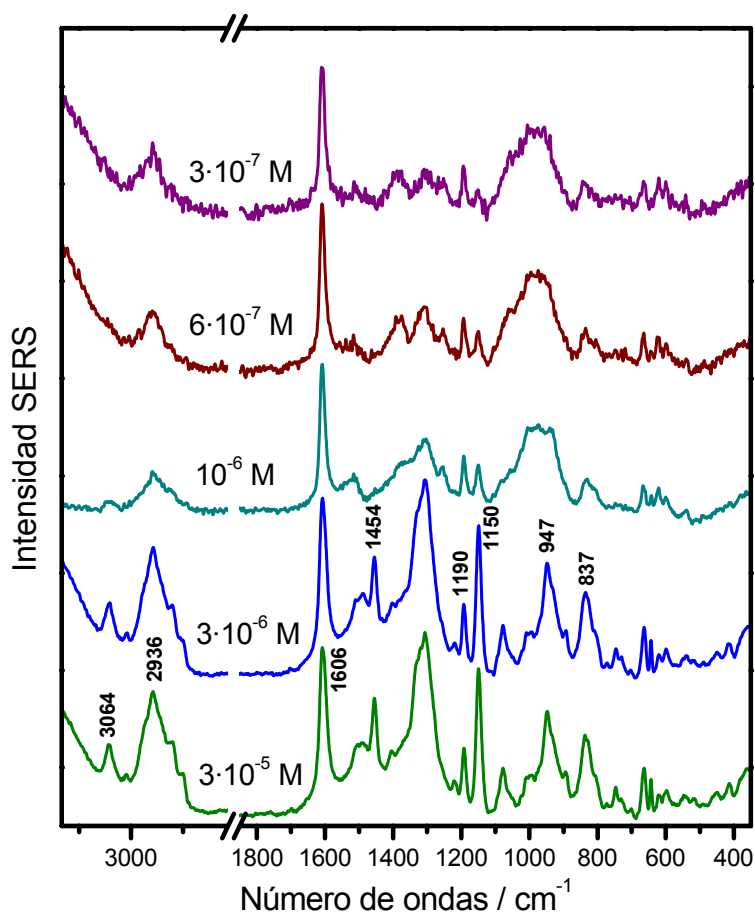


Figura 5.41. Espectros SERS de la AGI a diferentes concentraciones y pH 9.0.

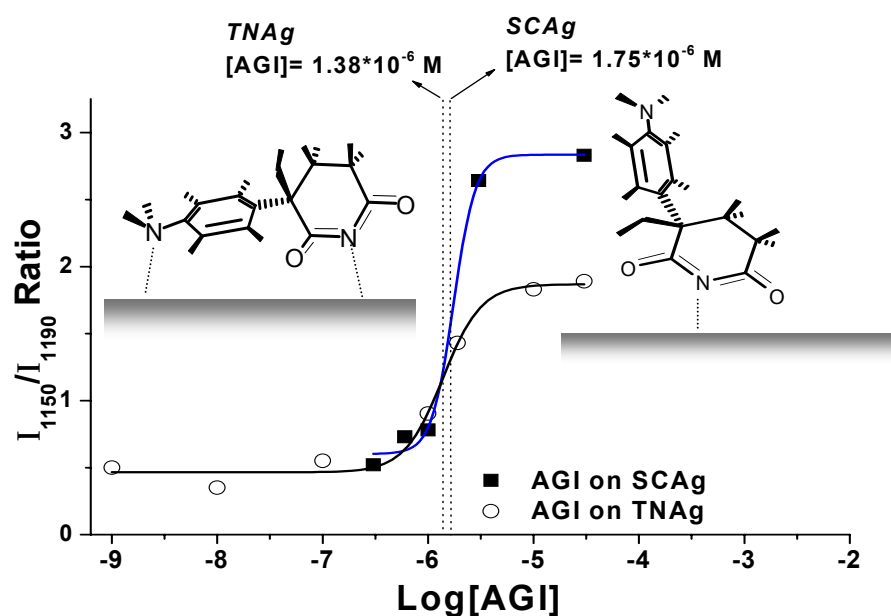


Figura 5.42: Representación de I_{1150}/I_{1190} frente a $[AGI]$, y reorientación molecular sobre la superficie desde una interacción bidentada a monodentada inducida al cambiar el recubrimiento de la superficie.

Puesto que la configuración monodentada implica una interacción fuerte a través del átomo de N del grupo GI, además de la intensificación relativa de las bandas SERS que corresponden a esta parte de la molécula, es de esperar una modificación en las bandas de la imida. Así ocurre con la banda ancha a $1350\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, y la banda intensa a 1150 cm^{-1} , asignadas a las nuevas vibraciones $\nu(\text{C}::\text{N})$ y $\nu(\text{C}::\text{O})$ resultantes de la formación de un enlace fuerte Ag-N que induce una mayor deslocalización electrónica en el grupo imida (Tabla 9.4 del Anexo 2). La formación de este enlace también se justifica por la aparición de una nueva banda a 214 cm^{-1} (fuera de la escala mostrada en las figuras), que se atribuye a la tensión del enlace Ag-N^[186]. Por último, la configuración monodentada implica una orientación más perpendicular del anillo de anilina, lo que explica la intensificación de la banda de tensión C-H del anillo a 3064 cm^{-1} .

Con el fin de investigar en más detalle la reorientación de AGI sobre la superficie de Ag, se representó la relación I_{1150}/I_{1190} frente a la concentración de AGI en los coloides de AgCT y AgNPT. Esta representación dio lugar a curvas sigmoidales que presentan una transición ($[\text{AGI}]_t$) a $1.75\text{ }\mu\text{M}$ y $1.38\text{ }\mu\text{M}$, respectivamente (Fig. 5.42). La $[\text{AGI}]_t$ será aquella a la cual $[\text{B}]=[\text{M}]$. Por lo tanto a una concentración de AGI $3\text{ }\mu\text{M}$ se deduce que la molécula se encuentra adsorbida uniformemente en configuración monodentada ($[\text{M}]\gg[\text{B}]$) tanto en AgCT como en AgNPT.

A partir de las concentraciones de transición $\text{B} \rightarrow \text{M}$, puede calcularse que el área por molécula cuando se alcanza un máximo de recubrimiento en orientación bidentada, paralela a la superficie, es de 1.12 y 0.65 nm^2 para AgCT y AgNPT, respectivamente. Estos valores son levemente superiores al área teórica de la AGI (0.52 nm^2), una discordancia que puede atribuirse a la presencia de otras especies también adsorbidas en la superficie de Ag (citrato y bromuro), que impide el recubrimiento completo de la misma.

Por otro lado, aunque la concentración de saturación en AgNPT es similar a la encontrada para las partículas esféricas, el valor máximo de I_{1150}/I_{1190} es menor, lo que sugiere que la unión monodentada de la AGI en este sustrato no implica una orientación totalmente perpendicular a la superficie. Asimismo, la presencia de iones Br^- coadsorbidos en la superficie debilita la interacción Ag-imida, al disminuir el carácter ácido de Lewis de los iones Ag interfaciales, probablemente debido a una transferencia

parcial de carga desde el anión al metal^[187], lo que provoca, a su vez, un aumento del potencial eléctrico en la superficie^[188].

C. Probenecid

El estudio de los espectros SERS de probenecid sobre diferentes metales y sustratos metálicos reveló que, al contrario que los AAB β , esta molécula sólo presenta afinidad por superficies de Ag, no siendo posible registrar su espectro SERS en coloide de Au. En este caso los espectros SERS más intensos se obtuvieron empleando la línea de excitación a 532 nm. La comparación de los espectros SERS obtenidos sobre AgCT y AgHX (Figura 5.43) indica que los mejores resultados se obtienen sobre AgCT.

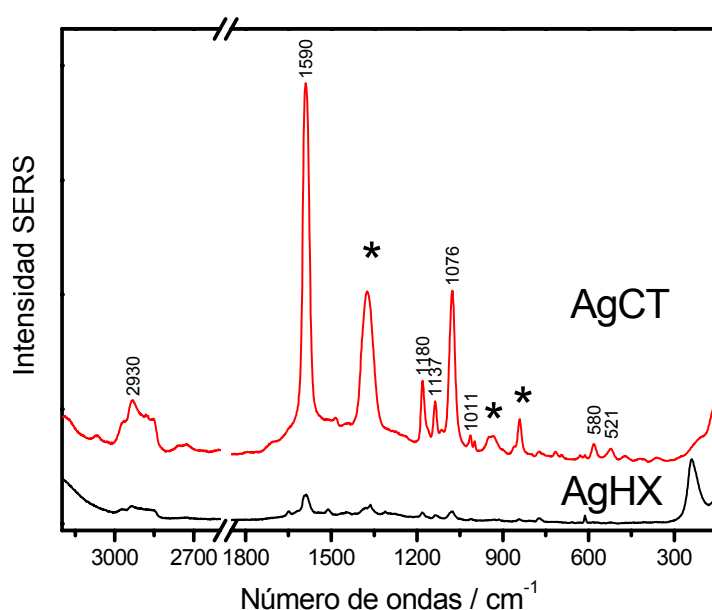


Figura 5.43. Espectros SERS de probenecid ($10^{-3}M$) en coloide de AgCT y AgHX, a pH 5, normalizados a la banda del agua. Excitación a $\lambda_{exc} = 532$ nm

Es probable que este efecto sea debido a la presencia de iones Cl^- sobre la superficie de las NPs en el coloide de AgHX, que impiden la adsorción de esta molécula.

Al igual que para las moléculas anteriores, se realizó un estudio del SERS de PB al variar el pH y empleando coloide AgCT, con la intención de optimizar las condiciones de medida y deducir su mecanismo de adsorción. La Fig. 5.44 muestra los espectros SERS del probenecid a distintos pH normalizados a la banda del agua. Se observa un progresivo aumento de las bandas del PB, especialmente de la banda del anillo aromático a 1595 cm^{-1} , a medida que el pH decrece. Sin embargo la disminución de pH induce también una considerable intensificación de las bandas del citrato (indicadas con asteriscos en la figura). El PB exhibe por lo tanto, un comportamiento

típico de las especies con carácter ácido, que se detectan de manera más intensa a pH bajo debido a un efecto de reparto entre la interfase y la disolución acuosa. A pH neutro o básico, el PB se encuentra ionizado aumentando su tendencia a permanecer en disolución, debido a la mayor hidratación de la forma aniónica. Sin embargo, a pH ácido la forma neutra de PB tiende a adsorberse sobre la superficie del metal debido a la menor hidratación de la forma neutra.^[189]

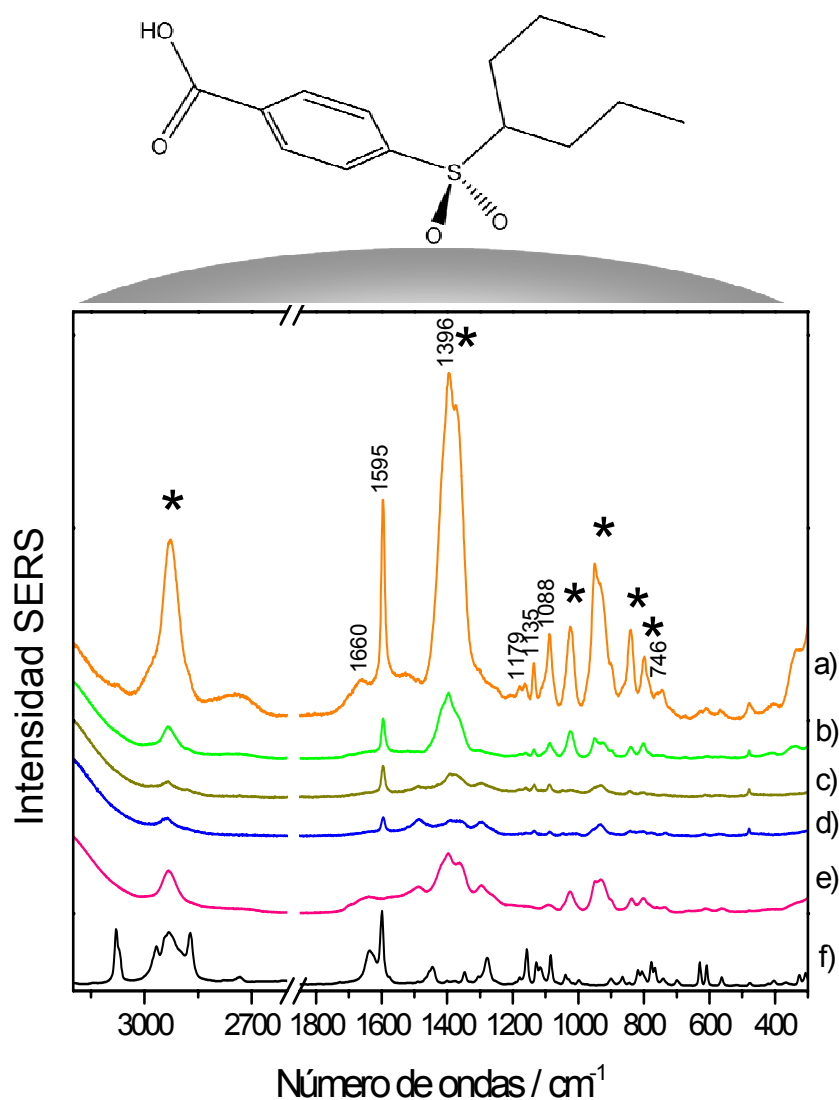


Figura 5.44. Esquema del mecanismo de interacción y orientación de PB sobre Ag. Espectros SERS a de PB (5×10^{-4} M) en coloide de AgCT, a los siguientes valores de pH: a) 4.5, b) 5.5, c) 6.1, d) 8.5, e) Espectro control del coloide AgCT, f) espectro Raman de PB sólido. Excitación a $\lambda_{exc} = 532$ nm

El cambio principal que se observa al variar el pH es la variación de intensidad absoluta de las bandas, sin que se aprecien modificaciones significativas del perfil espectral, lo que sugiere que no se produce ningún cambio en el mecanismo de adsorción el pH. El incremento del pH del coloide da lugar a una consiguiente desprotonación del ácido carboxílico, lo que conlleva una disminución de la atracción

hacia las nanopartículas, de potencial negativo debido a la presencia de iones citrato. De este modo, a pH alcalino la adsorción del PB en Ag está desfavorecida.

El espectro SERS del PB está totalmente dominado por los grupos aromático y sulfonamida de la molécula^[173]. Las bandas a 1595 y 1179 cm^{-1} debida a las vibraciones $\nu\text{C}=\text{C}$ y δCH del anillo aromático, ésta última acoplada a deformaciones del OH carboxílico. Es de destacar la notable intensificación de la banda a 1088 cm^{-1} debida a deformaciones del anillo acopladas a vibraciones $\nu\text{C}-\text{S}$ del grupo sulfonamida, como se vio en la sección 5.4.1. Asimismo, a 1135 cm^{-1} se observa la banda de tensión simétrica de enlace ($\nu_s\text{SO}_2$) del grupo sulfonamida, levemente desplazada hacia mayores frecuencias. Estos resultados indican que se produce una interacción del probenecid con la superficie del metal a través del grupo sulfonamida, lo que refuerza los enlaces $\text{S}=\text{O}$. La baja intensidad de la banda νCH del anillo aromático, que en el sólido aparece a 3080 cm^{-1} , y la intensificación de la banda a 746 cm^{-1} , asignada a vibraciones fuera del plano, sugieren una orientación paralela del anillo respecto a la superficie para facilitar la interacción de PB a través del grupo sulfonamida.

5.4.3. Detección SERS de analitos mediante la funcionalización de la superficie metálica

A) Detección de nandrolona empleando ditiocarbamato de β -ciclodextrina

La detección de nandrolona (NR) mediante adsorción directa sobre la superficie metálica no es posible sobre ninguna de las nanopartículas obtenidas en este trabajo y a ningún pH. Esto se atribuye a la falta de afinidad de esta molécula por las superficies empleadas en la detección SERS, ya que se trata de una molécula altamente insoluble y apolar que no presenta grupos funcionales activos capaces de interaccionar con los metales. Consecuentemente, la detección SERS de esta molécula pasa necesariamente por la funcionalización de las superficies empleadas.

Por ello se llevó a cabo una investigación consistente en el empleo de diferentes tipos de moléculas encapsuladoras, ya empleadas con anterioridad en nuestro grupo, para llevar a cabo la funcionalización de las nanopartículas metálicas. Concretamente se emplearon moléculas bifuncionales como diaminas, ditiolos y lucigenina. Sin embargo,

ninguna de estas moléculas proporcionó un resultado positivo, ya que no se observaron bandas de la NR con ninguna de ellas, lo que indica que existe una baja interacción del analito con estas sustancias.

La ciclodextrina (CD) es una molécula de inclusión que puede interactuar con moléculas similares a la NR, como progesterona y testosterona, según estudios previos realizados por Cai, Khomutov o Ma^[130, 131, 190]. Incluso la espectroscopía Raman ha sido empleada en la caracterización de complejos entre la β CD y progesterona^[191]. Por lo tanto, la funcionalización con ciclodextrinas constituye una estrategia eficaz para estimular la aproximación de NR a la interfase y la consiguiente detección del compuesto mediante SERS.

El problema del empleo de ciclodextrinas para la funcionalización de superficies metálicas es también su baja afinidad por dichas superficies. Como ya se indicó en la sección 5.2.2, estas moléculas pueden incrementar su afinidad por las NPs metálicas mediante la inclusión de un grupo ditiocarbámico (DTCH) en su estructura, mediante la síntesis del compuesto DTCDH. Este compuesto es capaz de interactuar con NPs de Ag y la caracterización de su adsorción se realizó en la sección 5.2.2, así como el estudio a diferentes concentraciones para optimizar la adsorción de molécula receptora sobre la superficie.

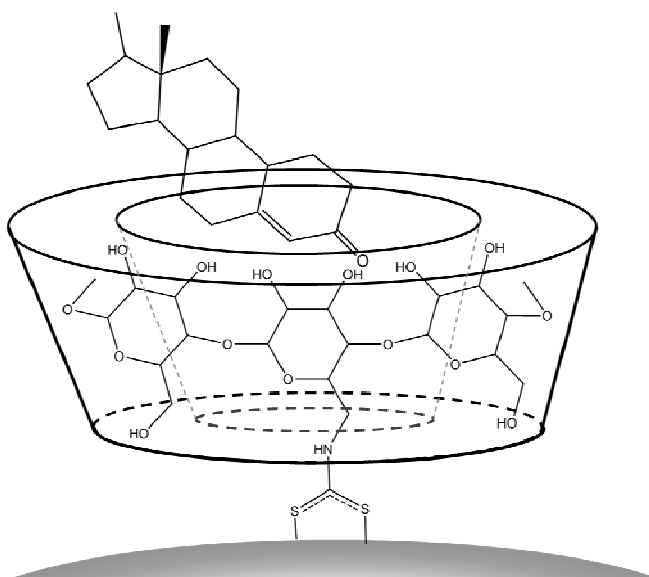


Figura 5.45. Complejo de inclusión entre NR y DTCD sobre la superficie de Ag que permite el acercamiento de NR al metal y su detección SERS

La funcionalización de NPs de Ag con DTCDH permitió la obtención de espectros SERS de NR, gracias a la inclusión del analito en la cavidad interior de la

ciclodextrina (Figura 5.45), y su consiguiente aproximación a la superficie del metal para beneficiarse de la intensificación SERS. Este resultado permitió llevar a cabo un estudio SERS basado en la optimización de las diferentes variables experimentales que influyen en la detección de NR por DTCD, el cual se exponen a continuación.

En la Figura 5.46a se muestra el espectro SERS de NR (10^{-3} M) sobre NPs del coloide AgCT funcionalizadas con DTCD (5×10^{-4} M). Como puede observarse, este espectro consiste en una mezcla de bandas provenientes tanto de NR como de DTCD. Para resaltar el espectro SERS de NR, se obtuvo el espectro diferencia (Figura 5.46c) mediante sustracción del SERS de DTCD (Figura 5.46b). En la diferencia se distinguen las bandas de la nandrolona correspondientes a las vibraciones $\nu\text{C}=\text{O}$ y $\nu\text{C}=\text{C}$ a 1652 y 1616 cm^{-1} , respectivamente, las vibraciones ωCH_2 y tCH_2 , que aparecen a 1333 y 1272 cm^{-1} , y la banda δOH a 1214 cm^{-1} , así como algunas de las bandas de vibración de esqueleto por debajo de 800 cm^{-1} (728, 411 y 381 cm^{-1}).

Cuando se compara el espectro SERS de NR con el espectro Raman del sólido (Figura 5.46d) se aprecian diferencias notables en los grupos que contienen átomos de oxígeno. La banda $\nu\text{C}=\text{O}$ experimenta un debilitamiento respecto al sólido y la δOH sufre un desplazamiento hacia altas frecuencias (de 1208 a 1214 cm^{-1}). Estos cambios sugieren que la interacción de NR con el receptor se produce mediante enlaces de hidrógeno con los grupos OH del receptor. Asimismo, la interacción del grupo $\text{C}=\text{O}$ con los $-\text{OH}$ de CD influye sobre la banda $\nu\text{C}=\text{C}$ que se desplaza desde 1620 cm^{-1} , en el sólido, a 1616 cm^{-1} en el SERS.

De la observación de las bandas SERS de la NR puede deducirse, por tanto, que esta molécula entra en la cavidad de la ciclodextrina perpendicularmente a ésta, y el complejo de inclusión se produce por formación de enlaces de hidrógeno además de por la interacción hidrofóbica entre el esqueleto del receptor y el de la NR. Así pues, y conocido el mecanismo de anclaje de la DTCD sobre las NPs de Ag, se deduce que la NR se sitúa perpendicular a la superficie del metal.

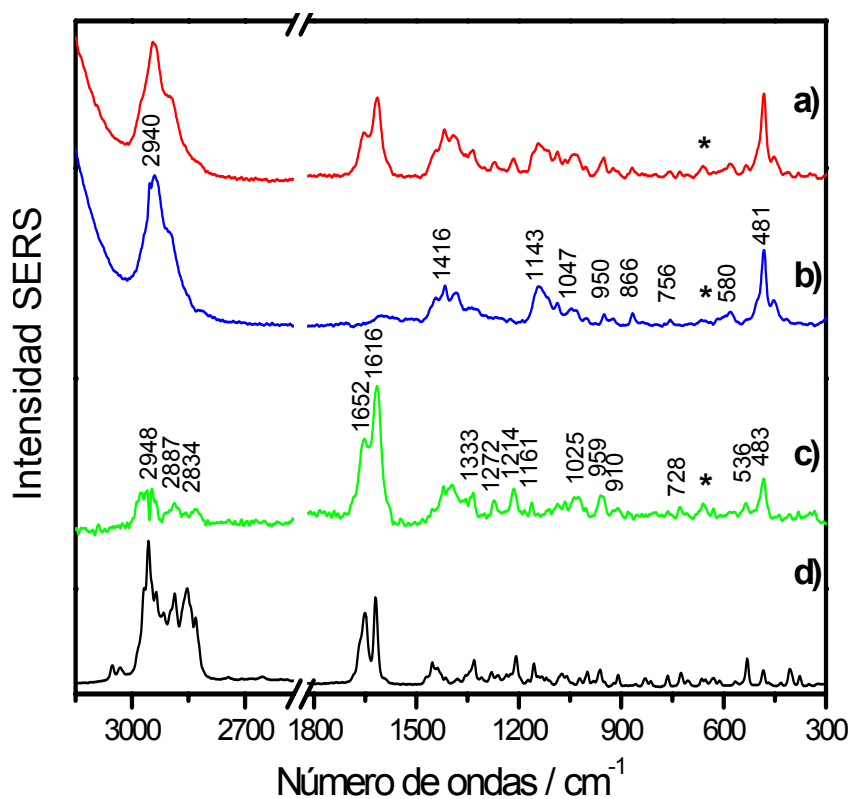


Figura 5.46. Espectros SERS de: a) NR (10^{-3} M) sobre NPs de AgCT funcionalizadas con DTCD (5×10^{-4} M); b) DTCD; c) Espectro diferencia [(a)-(b)]; d) Raman de NR sólida. Excitación a 532 nm

La adsorción de la NR sobre la superficie metálica sólo depende de la formación del complejo de inclusión con la DTCD. Es, por lo tanto, la adsorción de la molécula receptora la que debe optimizarse para la detección de NR. Esta optimización se llevó a cabo escogiendo la concentración de DTCD que dio lugar a una máxima señal de la NR. La variación del pH del coloide no influye sobre la adsorción de DTCD.

B) Detección del pesticida organoclorado Aldrín mediante nanopartículas de Ag funcionalizadas con ditioles

Como se vio en la sección 5.1.2, la funcionalización de NPs con agentes bifuncionales puede provocar una autoasociación y ensamblaje de NPs dirigida, que da lugar al crecimiento de dímeros o cadenas de NPs en los cuales se generan espacios interpartícula o *hot spots*. En estos casos el efecto del agente receptor es doble: a) intensificación del campo electromagnético en espacios interpartícula, y b) creación de nanosensores en estos mismos espacios en los que queda localizado y definido un espacio para la nanodetección. De hecho, las nanopartículas de plata funcionalizadas

con diaminas son sistemas que han probado su eficacia en la detección por SERS de los insecticidas policlorados α -endosulfan, β -endosulfan y aldrín^[91, 163].

Las NPs funcionalizadas y ensambladas con α,ω -ditiolos estudiadas en las secciones 5.1.2 y 5.2.1 se ensayaron como sistemas de detección para diferentes moléculas de difícil estudio directo con SERS. En primer lugar se estudió su aplicabilidad en la detección de SDD, en particular de nandrolona, terbutalina y probenecid. Sin embargo, estas moléculas no pudieron ser detectadas por este método. Esto se atribuye a dos razones principales: a) el tamaño de las cavidades generadas es insuficiente para albergar a estas moléculas; y b) la naturaleza aromática de los SDD hace que su afinidad por la superficie funcionalizada con moléculas alifáticas sea pequeña.

Sin embargo, las nanopartículas de Ag funcionalizadas con ditiolos mostraron una alta afinidad en la detección del pesticida aldrín. La estrategia seguida en la detección de esta sustancia se inspiró en su actividad tóxica. Los pesticidas organoclorados desarrollan su toxicidad principalmente a nivel de las membranas de las células nerviosas, inhibiendo el transporte de cationes (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+}) a través de las mismas^[192-194]. La interacción de estos pesticidas con sus blancos celulares tiene lugar mediante interacciones hidrofóbicas con las cadenas alifáticas de las membranas debido a su carácter lipofílico, por lo que la matriz lipídica de estas membranas constituyen el blanco principal de estas sustancias^[195, 196]. Estos pesticidas desarrollan un tipo de toxicidad no específico en insectos^[197-199]. Las cadenas alifáticas de ditiolos y diaminas tienen propiedades similares a las de la pared celular, por lo que las nanopartículas metálicas funcionalizadas con estas moléculas presentan una gran similitud con las membranas plasmáticas que constituyen el blanco celular de este tipo de pesticidas.

La aplicación de la técnica SERS permitiría la detección sensible y selectiva de estas sustancias. Sin embargo, estos pesticidas no son capaces de adsorberse sobre las NPs de Ag ni de Au, porque presentan una baja afinidad por estas superficies. Como en el caso de la NR, se hace necesaria una funcionalización adecuada de la superficie.

En la Figura 5.47, izquierda, se muestran los espectros SERS de las nanopartículas de Ag funcionalizadas con α,ω -ditiolos con cadena lineal alifática de longitud variable ($n=6, 8$ y 10) en la región $800\text{-}300\text{ cm}^{-1}$. Las cantidades de ditiol empleadas ($5 \times 10^{-6}\text{ M}$) aseguran un recubrimiento sólo parcial (sub-monocapa) de la

superficie total disponible. Es importante no recubrir completamente la superficie de las nanopartículas con moléculas de ditiol, ya que éstos tenderán a disponerse en configuración de empaquetamiento compacto y multicapas, como se vio en la sección 5.2.1, lo que dificultaría la inserción de los analitos en la monocapa, al disminuir el número de cavidades intermoleculares.

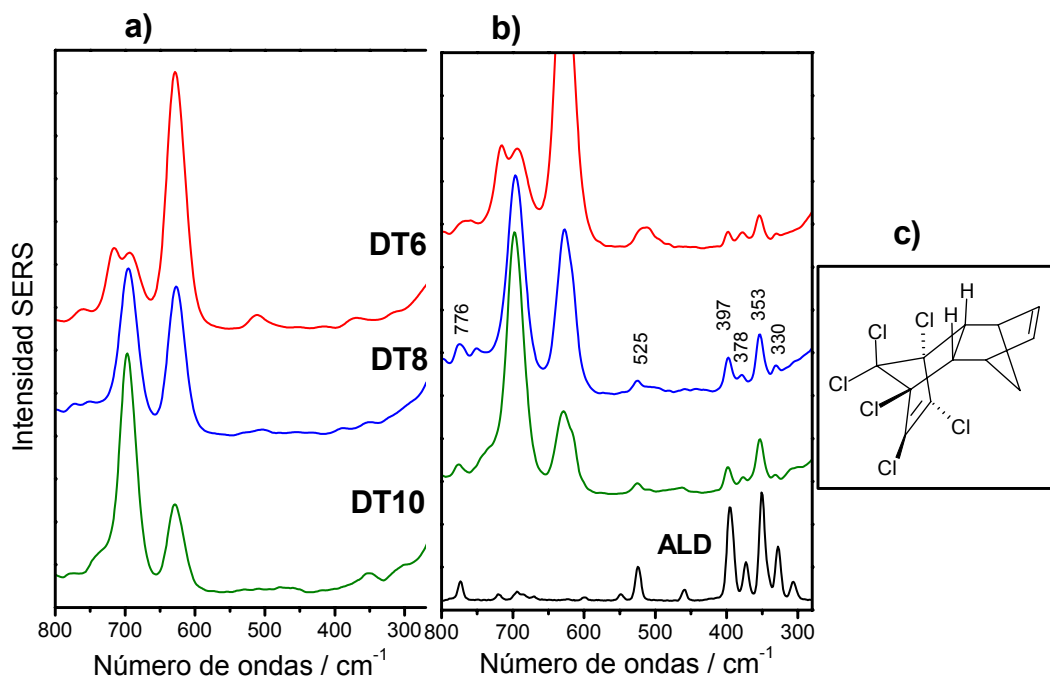


Figura 5.47. Espectros SERS a $\lambda_{exc} = 785$ nm de: DT6, DT8 y DT10 (5×10^{-6} M) a) en ausencia y b) en presencia de 360 ppb de Aldrín; c) Estructura del pesticida aldrín

Tras la adición del pesticida aldrín hasta una concentración de 10^{-6} M (360 ppb) se observan bandas características del compuesto a 776, 525, 397, 378, 353 y 330 cm⁻¹ (Fig. 5.47a)^[173, 200]. La intensidad de estas bandas es mayor en el caso de emplear DT8 y DT10. Este resultado se atribuye a la formación de espacios interpartícula más grandes en el caso de DT8 y DT10 en comparación a los formados con DT6. Los hot spots localizados en estos espacios dan lugar a la intensificación SERS necesaria para la observación del espectro SERS de aldrín.

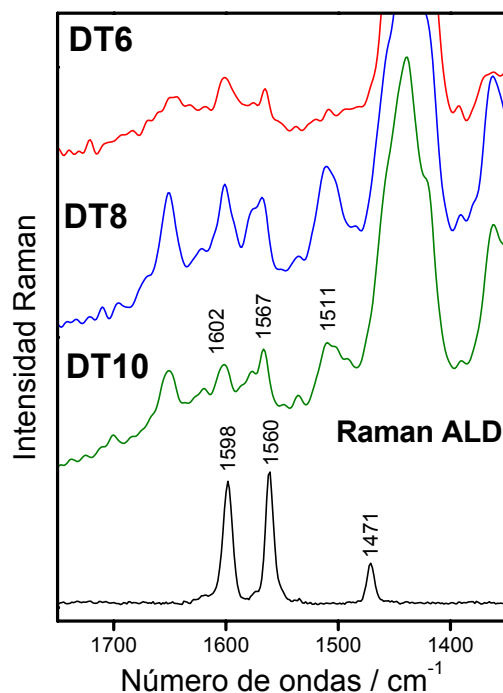


Figura 5.48. Región entre 1750 y 1350 cm^{-1} en los espectros SERS a $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$ de: DT6, DT8 y DT10 ($5 \times 10^{-6} \text{ M}$) en presencia de Aldrín

En comparación con el espectro Raman del pesticida en estado sólido (Fig. 5.47b, abajo) se observa un cambio en la intensidad relativa de las bandas que afectan a tensiones C-Cl, entre 400 y 300 cm^{-1} , así como un ensanchamiento de estas bandas. Estos cambios son más acentuados en el caso de ditiol DT8 y DT10 y pueden ser atribuidos a la orientación predominante que adopta el ligando dentro de la monocapa de ditiol. Las bandas correspondientes a $\nu\text{C}=\text{C}$ se observan con intensidad más baja a 1602 y 1567 cm^{-1} (Fig. 5.54) estando ésta última banda desplazada respecto al sólido, en donde aparece a 1560 cm^{-1} . De este desplazamiento se deduce que la banda a 1567 cm^{-1} corresponde a vibraciones $\nu\text{C}=\text{C}$ adyacentes a los átomos Cl.

En cuanto a las bandas del ditiol, se observa que en presencia del pesticida la relación de bandas I_{700}/I_{630} en DT8 y DT10 aumenta en aproximadamente un 20% respecto al correspondiente valor a la misma concentración en ausencia de ligando. De este resultado se deduce que el pesticida en su inserción en la monocapa de ditiol induce un mayor ordenamiento de las cadenas alifáticas.

Por lo tanto, de los correspondientes espectros SERS se puede obtener también información estructural relevante acerca del mecanismo de interacción entre los ditiol y el ligando.

5.5 Análisis cuantitativo de sustancias de dopaje deportivo mediante SERS

Para el análisis cuantitativo de SSD mediante SERS es necesario llevar a cabo un estudio de la adsorción de estos compuestos sobre las NPs para las que son activos y bajo las condiciones óptimas determinadas en los capítulos precedentes. En la sección 5.4 se ha llevado a cabo un estudio de los espectros SERS y de la adsorción de los analitos estudiados bajo un punto de vista cualitativo. Es decir, se han desgranado todos aquellos aspectos que influyen en la adsorción, y se han deducido los mecanismos de interacción, así como la orientación en base a la información aportada por los espectros SERS.

En esta sección se aborda la adsorción bajo un punto de vista más cuantitativo, sólo en las condiciones óptimas deducidas anteriormente. En este estudio se ha empleado la espectroscopía SERS para la obtención de las isotermas de adsorción de estas moléculas, lo que se considera un paso previo y necesario para conseguir, por una parte, más información sobre la adsorción, y por otra, para la detección cuantitativa, sensible y selectiva, de cada una de las sustancias analizadas.

5.5.1. Isotermas de adsorción

La mayor parte de las moléculas estudiadas en esta Tesis presentan una cinética de adsorción tipo Langmuir, que se caracteriza por la formación de una monocapa de adsorbato sobre la superficie hasta que se alcanza la saturación de la misma. Como vimos en la sección 2.4., en este caso la ecuación que rige el recubrimiento de una superficie (θ) al aumentar la concentración de un adsorbato A en el medio es:

$$\theta = \phi / \phi_0 = \frac{K_{ad}[A]}{1 + K_{ad}[A]} \quad (4)$$

Donde K es la constante de adsorción de Langmuir en la superficie, ϕ es el número de moléculas adsorbidas a la concentración $[A]$ y ϕ_0 es el número máximo de moléculas que pueden adsorberse dada la superficie total disponible. Debido a que la intensidad SERS depende exclusivamente del número de moléculas adsorbidas sobre la superficie plasmónica, (es decir, $I_s = a \cdot \phi$), la fracción de recubrimiento puede

relacionarse con la intensidad SERS mediante I_s/I_{sm} (donde I_s es la intensidad del espectro SERS del adsorbato incluido a una concentración $[A]$ e I_{sm} es la intensidad SERS en condiciones de saturación de la superficie). Por lo tanto, puede construirse una isoterma de adsorción empleando una ecuación tipo Langmuir para ajustar la intensidad SERS frente a la concentración del compuesto en la muestra analizada, tal que:

$$I_s = \frac{K_{ad} I_{sm} [A]}{1 + K_{ad} [A]} \quad (7)$$

A partir de las isotermas de adsorción, la detección de la molécula puede entonces ser realizada por debajo de $[SDD]_{max}$, y por encima de la concentración mínima que constituye el límite de detección (LD). Es conveniente encontrar entre estas concentraciones la denominada región de linealidad (RL), es decir, el intervalo de concentraciones en el que la relación entre la intensidad SERS y la concentración sigue un patrón lineal. Esta zona lineal constituirá la recta de calibrado para llevar a cabo la detección del compuesto que se discutirá más adelante en la sección 5.4.5.

En la construcción de isotermas de adsorción mediante SERS se ha empleado la siguiente metodología: a) obtención de espectros SERS en condiciones óptimas (empleando el sustrato SERS, el pH y la longitud de onda de excitación que da lugar a máximas intensidades SERS); b) selección de bandas marcadoras que se relacionen con la cantidad de analito en la muestra (generalmente se eligió una banda intensa que esté poco afectada por posible efectos de reorientación que pudiera sufrir la molécula al variar su concentración); c) selección de banda de referencia para la obtención de las intensidades relativas de las bandas marcadoras.

La banda de referencia es un tema crucial en esta investigación, ya que permite contrarrestar el posible efecto de la agregación de NPs provocado por la adición de las diferentes especies para el análisis. En ocasiones se ha empleado como banda de referencia la banda $\nu(\text{Ag-NO}_3^-)$ a 250 cm^{-1} , debida a la adsorción del nitrato empleado como agente agregante. En otras ocasiones se ha empleado la banda $\nu(\text{O-H})$ del agua a 3400 cm^{-1} como referencia, dependiendo de la posibilidad de observación de esta última en función de la excitación láser empleada en cada caso. La elección de una banda de referencia externa como la del agua para referenciar las intensidades SERS medidas del analito podría conducir a resultados erróneos en las isotermas, ya que el propio analito induce una agregación de la suspensión coloidal, lo que daría lugar a valores aparentes

de los parámetros de adsorción. Sin embargo, como se ha visto anteriormente (sección 5.3.2), la agregación debida al propio analito sólo comienza a ser significativa a valores por encima del recubrimiento total de la superficie disponible, es decir, fuera del intervalo de linealidad de la recta de calibrado que se obtiene para la relación $I_{\text{SERS}}/[\text{Analito}]$.

Con el fin de obtener datos analíticamente significativos, se hicieron tres medidas para cada concentración y los valores de intensidad SERS representados corresponden a la media de tres réplicas, siendo las barras de error los intervalos de confianza de la media con $\alpha=0,05$. Los resultados obtenidos para cada una de las SDD se exponen a continuación.

A partir de las isothermas de adsorción se calcularon los parámetros cuantitativos asociados a la adsorción, es decir, la constante de adsorción (K_{ad}), relacionada con la afinidad de la molécula por la superficie, la intensidad SERS máxima (I_{sm}) y la máxima concentración de sustancia adsorbida ($[SDD]_{max}$), variables éstas que representan el límite superior de concentración detectable, el cual está relacionado a su vez con la superficie total de adsorción disponible sobre todas las nanopartículas ofrecidas al analito.

A. Adsorción de agonistas adrenérgicos β_2 .

Como se vio en la sección 5.4.2.A, en el caso de los AA β , la adsorción únicamente tiene lugar sobre superficies de Au. Los resultados de este análisis para los AA β estudiados sobre coloide AuCT se muestran en la Figura 5.49. Las bandas marcadoras seleccionadas para cada sustancia son las que aparecen a 1269 cm^{-1} para el CB a pH ácido, a 985 cm^{-1} para TB a pH ácido y a 1535 cm^{-1} para SB a pH alcalino. Las intensidades de las bandas marcadoras están referenciadas en intensidad a la banda del ión NO_3^- , es decir la correspondiente a la vibración $\nu(\text{Ag-NO}_3^-)$, que se adicionó para activar la suspensión, quedando a una concentración fija de 30 mM.

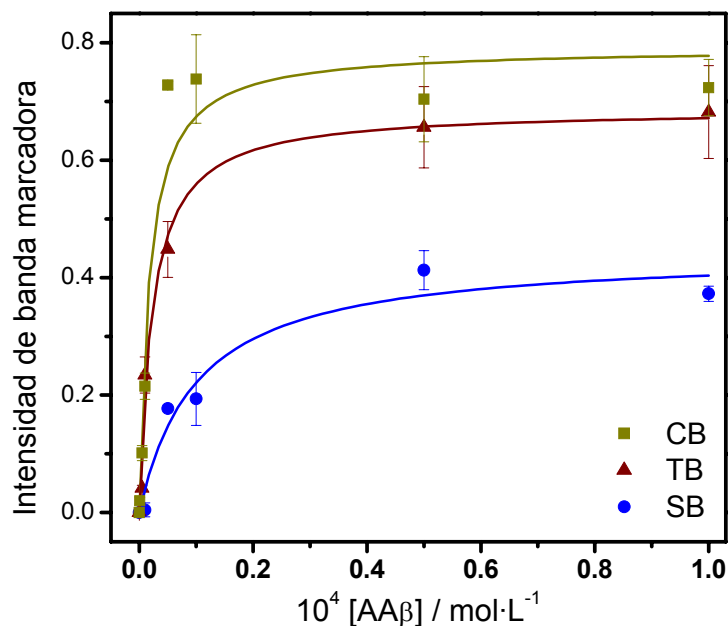


Figura 5.49. Intensidad SERS de las bandas marcadoras frente a concentración de AA β ($\lambda_{exc} = 785$ nm) y ajustes a curvas de Langmuir.

De las gráficas de la Figura 5.49 se deduce que los AA β estudiados siguen un modelo de adsorción tipo Langmuir. Lo que implica una saturación de la intensidad a partir de una determinada concentración, que corresponde a la saturación sobre la superficie, y una dependencia lineal a bajas concentraciones. El hecho de que estas moléculas sigan este modelo indica que la adsorción se produce sin que haya interacciones intermoleculares significativas entre los adsorbatos.

Mediante el ajuste de datos descrito anteriormente, se obtuvieron los correspondientes parámetros de adsorción para estas moléculas, es decir la K_{ad} y I_{sm} , que se muestran en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Resultados del ajuste a curvas de Langmuir. Constantes de adsorción en las nanopartículas de oro para cada dopante AA β .

	$10^5 K_{ad} / \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	I_{sm}	R
Clembuterol	$5.8 \pm 2,1$	0.791 ± 0.058	0.97
Terbutalina	4.41 ± 0.53	0.687 ± 0.016	0.998
Salbutamol	0.99 ± 0.34	0.444 ± 0.042	0.98

La K_{ad} es una medida de la afinidad del adsorbato por la superficie, pero está también relacionada con la sensibilidad de la detección SERS de estos compuestos, pues

determina la pendiente de la parte lineal que se observa a concentraciones por debajo de 10^{-5} M.

Como se vio en el sección 2.3 , la intensificación más importante en SERS se produce debido al mecanismo electromagnético^[39, 40]. Dado que la sección eficaz Raman de estas tres moléculas es similar, las diferencias existentes entre los EF de estos compuestos se deben a la distinta afinidad (K_{ad}) de cada uno de los AA β por la superficie de Au, lo que a su vez determina el número de moléculas que se adsorben en la misma. El valor más alto de K_{ad} se obtuvo para el CB, lo que se a la fuerte interacción entre la fracción anilínica de esta molécula y la superficie de Au. Este mecanismo de interacción resulta ser más fuerte que la interacción con los grupos amino alifático o resorcinol deducidos para TB y SB.

B. Adsorción de Aminoglutetimida

En el caso de la AGI se ha llevado a cabo un estudio más extenso de su adsorción debido a su afinidad tanto por superficies de Au como de Ag, según se vio en la sección 5.4.2.B. Por lo tanto, las isotermas de adsorción de este compuesto se han obtenido en superficies de AuCT, AgCT y AgNPT con el fin de llevar a cabo un estudio comparativo de la sensibilidad de todos estos sustratos.

Los resultados mostrados en la sección 5.4.2.B indican que sobre NPs de Au, las mejores condiciones experimentales para la elaboración de la isoterma de adsorción son: pH 5.0 y excitación a 785 nm. Como banda marcadora para el cálculo de las intensidades relativas se ha empleado la banda estrecha a 647 cm^{-1} , que corresponde a la porción anilínica que se une a la superficie. La representación de la intensidad de esta banda frente a la concentración de AGI se muestra en la Figura 5.50.

Igual que en el caso de los AA β , al tratarse de NPs de Au, se realizaron los experimentos utilizando como fuente de excitación la línea de 785 nm, lo que limita la sensibilidad por encima de los 2000 cm^{-1} , debido a la baja sensibilidad del detector CCD en esa región del espectro. Por lo tanto, la banda del agua a 3200 cm^{-1} no puede ser empleada como referencia para el cálculo de la intensidad relativa. Así que los valores de la intensidad fueron referidos a la banda $\nu(\text{Ag-NO}_3^-)$. Los parámetros de adsorción deducidos del ajuste anterior se recogen en la Tabla 5.7. La K_{ad} obtenida, del orden de $10^5\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, indica una fuerte interacción entre la molécula y la superficie de oro, aunque no tan alta como en el caso de los AA β .

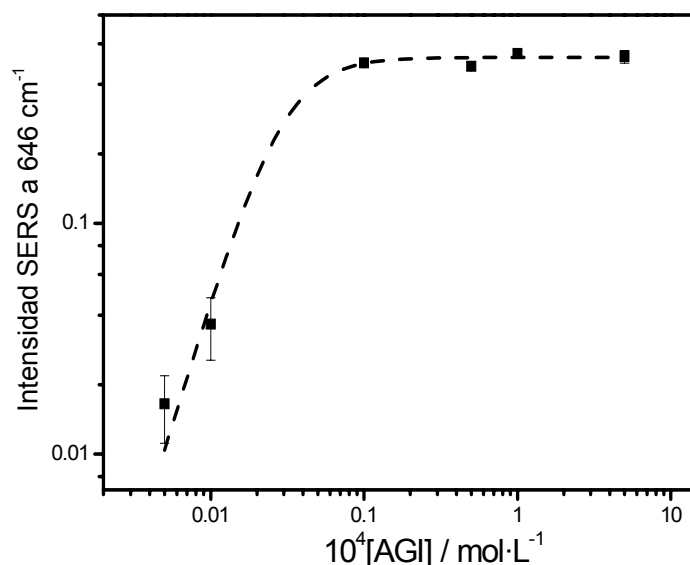


Figura 5.50. Intensidad SERS de la banda a 647 cm^{-1} frente a la concentración de AGI, y ajuste a una curva de Langmuir. $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$.

Como se ha mostrado en la sección 5.4.2, la adsorción de AGI es mayor sobre superficies de plata a pH alcalino, siendo el mecanismo de adsorción el establecimiento de enlaces de coordinación de los átomos de N anilínico e imídico de la molécula de AGI neutra con la superficie de plata. Las isothermas de adsorción de la AGI se obtuvieron sobre NPs de Ag en diversos coloides, lo que permitió un estudio comparativo entre nanoesferas y nanoprismas de plata como posibles sustratos SERS en estudios cuantitativos. En particular, esta investigación permitió estimar la viabilidad de los nanoprismas, más activos desde el punto de vista plasmónico en términos de factor de intensificación, en relación con las NPs de Ag de morfología esférica, más ampliamente utilizados en aplicaciones de la técnica SERS. Para llevar a cabo este estudio, las NPs AgNPT se compararon con las del coloide AgCT, puesto que este último sustrato dio lugar al mayor valor de EF en comparación con el de coloides AgHX ó AgBH.

Así pues, las isothermas de adsorción de la AGI sobre Ag se construyeron utilizando AgCT y AgNPT como sustratos, y fijando el pH a 9.0. Debido al cambio del perfil espectral, se tomó en este caso como banda de referencia la correspondiente a la vibración $\nu\text{C}=\text{C}$ que aparece a 1606 cm^{-1} . Esta banda se normalizó a la banda del agua a 3400 cm^{-1} . La Figura 5.51 muestra la variación de la intensidad SERS de esta banda frente a la concentración de AGI tanto en AgCT como en AgNPT.

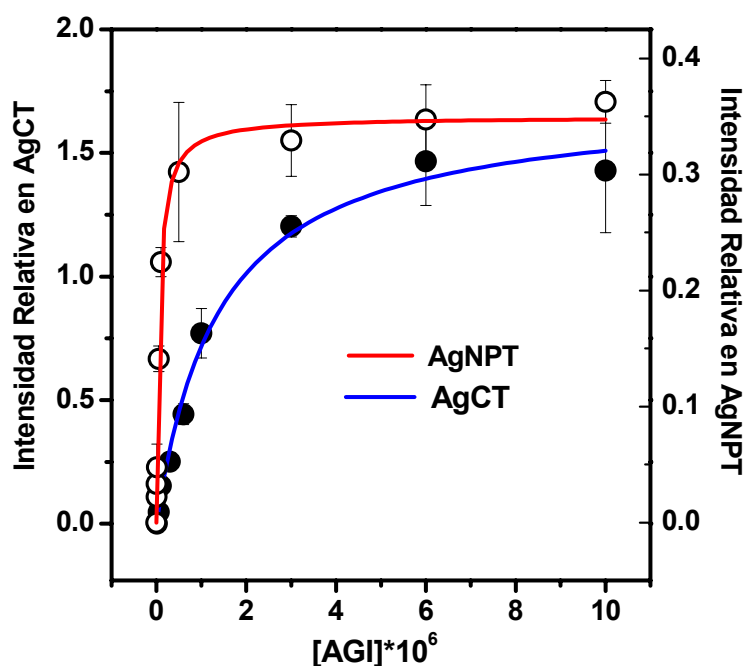


Figura 5.51. Variación de la intensidad relativa de la banda SERS a 1606 cm^{-1} en AgCT (azul) y AgNPT (rojo) al variar la concentración de AGI. Excitación a 632.8 nm

Las isotermas de adsorción mostradas en las Figuras 5.50 y 5.51 indican que la adsorción de la AGI sobre superficies de Au y de Ag sigue también un modelo Langmuir, con saturación de la intensidad a una determinada concentración. Al igual que en el caso de los AA β , este resultado sugiere que la adsorción se produce sin que haya interacciones intermoleculares significativas entre moléculas de AGI sobre la superficie.

Los parámetros de adsorción calculados mediante el ajuste Langmuir correspondiente se muestran en la Tabla 5.7. Los altos valores de K_{ad} calculados indican que esta molécula presenta una elevada afinidad por la superficie de los metales. Sin embargo, se observa que la AGI presenta una mayor afinidad para la Ag que para el Au, probablemente debido a la fuerte interacción que se establece entre el grupo imida del grupo GI y el metal, ya que se trata de un enlace covalente de coordinación, el cual es más fuerte que la interacción iónica entre la fracción anilínica y el oro que se establece a pH ácido.

Aunque la K_{ad} debería ser la misma en todos los sustratos de plata, el valor mayor de K_{ad} calculado para los AgNPT frente al AgCT se atribuye a un efecto aparente derivado de la mayor intensificación del campo electromagnético en las esquinas de los nanoprismas y en las uniones interpartícula entre las caras planas, donde se forman los

hot spots. Así pues, podemos considerar que $(K_{ad})_{AgNPT} = p \cdot (K_{ad})_{AgCT}$, donde p es un factor relacionado con las ventajas derivadas de la intensificación de campo de los nanoprismas de plata en comparación a las partículas esféricas. El factor p resultó ser de 20.8 para los nanoprismas triangulares empleados.

Tabla 5.7. Parámetros de adsorción calculados a partir de los ajustes de Langmuir de la AGI sobre AuCT, AgCT y AgNPT.

Parámetro	AuCT	AgCT	AgNPT
$K_{ad} \cdot 10^{-5} \text{ (L} \cdot \text{mol}^{-1}\text{)}$	2.5 ± 1.1	7.20 ± 0.10	150 ± 20
I_{sm}	0.555 ± 0.040	1.72 ± 0.07	0.350 ± 0.006
$[AGI]_{max} \text{ (}\mu\text{M)}$	6.0-9.0	6.0	1.0-3.0
R^2	0.9994	0.991	0.994

A partir de la información de las Figuras 5.50 y 5.51, puede deducirse la concentración de AGI a la cual se obtiene una intensidad SERS máxima ($[AGI]_{max}$), que es de 1.0-3.0 μM para los AgNPT, 6.0 μM para el AgCT, y de 6.0-9.0 μM para el AuCT. En el caso de la adsorción en Ag, estos valores están correlacionados con la concentración a la cual se completa la reorientación de las moléculas de AGI de conformación bidentada a monodentada descrita en la sección 5.4.2, que corresponde a una concentración 3 μM . Además, este valor coincide con la concentración teórica de recubrimiento máximo, que puede deducirse dividiendo la superficie total de adsorción de cada coloide entre el área estimada por molécula en orientación monodentada (0.30 nm^2), resultando valores de 3.15 y 6.75 μM para AgNPT y AgCT, respectivamente. Estos valores se corresponden con las concentraciones de saturación deducidos de las gráficas 5.50 y 5.51. De estos resultados se deduce que el recubrimiento total de la superficie por AGI lleva asociada una reorientación de esta molécula sobre el metal. Por encima de esta saturación, el sistema se vuelve insensible a la concentración del analito y no es posible su detección mediante SERS. La obtención de un valor más bajo de $[AGI]_{max}$ para los AgNPT se debe obviamente a una superficie disponible menor, por la permanencia de iones bromuro adsorbidos en la Ag que no se desorben por la acción de la AGI ni de los OH^- ^[188], mientras que en el caso del AgCT, los iones citrato están totalmente desorbidos a pH 9.0.

La intensidad SERS relativa máxima (I_{sm}) está relacionada con el valor de $[AGI]_{max}$. El valor más alto de I_{sm} observado en la superficie del AgCT en comparación con el AgNPT (aproximadamente 4 veces superior) indica que estas nanopartículas

pueden adsorber un mayor número de moléculas, no solo debido a un valor de Superficie Total de Adsorción más elevado (Tabla 5.5, p. 108), del orden del doble, sino también por la presencia de iones bromuro en la superficie de los nanoprismas triangulares, que limita considerablemente el recubrimiento máximo alcanzable.

C. Probenecid

El estudio del mecanismo de adsorción del PB sobre NPs de Ag mostrado en la sección 5.4.2 indica que las condiciones óptimas para la detección de esta sustancia son el empleo del coloide AgCT a un pH 4.0. Aunque a pH ácido también se favorece la adsorción de los iones citrato, que compiten por la superficie disponible, la adsorción del PB a pH alcalino es muy débil, por lo que el efecto de desplazamiento de iones citrato por los OH^- no compensa la disminución de intensidad de las bandas del PB. Para obtener la isoterma de adsorción se utilizó como fuente de excitación el láser a 532 nm, y, como banda marcadora, se siguió la evolución de la banda $\nu\text{C}=\text{C}$ a 1595 cm^{-1} referida en intensidad a la banda Raman del agua a 3400 cm^{-1} .

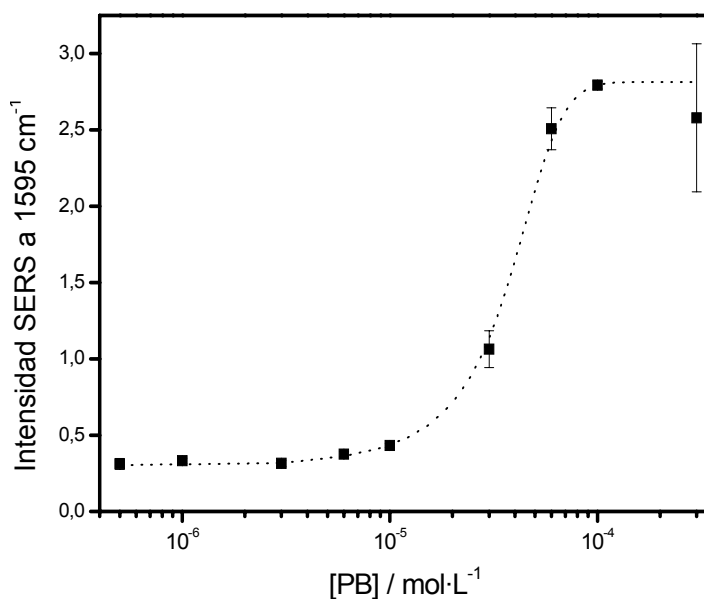


Figura 5.52. Intensidad de la banda a 1595 cm^{-1} del PB frente a la concentración de analito en el coloide AgCT. Excitación a 532 nm.

La isoterma de adsorción muestra un perfil sigmoide de la curva $I_{\text{SERS}}/[\text{PB}]$ (Figura 5.58), que corresponde a un modelo de adsorción tipo V de la clasificación B.D.D.T.^[65] (sección 2.4.1). Esto indica que la adsorción del PB sobre Ag sigue un mecanismo de tipo B.E.T. con saturación, que se da en modelos de adsorción que

implican la formación de multicapas en las que las moléculas interactúan con la superficie y entre sí mediante constantes de equilibrio similares ($K_{ad} \cong K_2$) [63, 64], formando multicapas poco homogéneas sobre la misma. En estos procesos, tienen lugar dos equilibrios diferentes: el correspondiente a la formación de la primera capa, cuyos términos dependen de la interacción de la molécula con la superficie, y el que depende de la asociación de las moléculas de adsorbato entre sí, que ocurre en la segunda capa y sucesivas. Debido a que las constantes de asociación son similares, en las adsorciones de tipo V no se produce una saturación de la superficie antes de la formación de multicapas, sino que la adición de nuevas moléculas tiene lugar simultáneamente sobre el metal y sobre las capas de adsorbato fijadas previamente.

En el caso del PB, las moléculas pueden seguir acumulándose formando multicapas, pero no de forma ilimitada. Como muestra la Figura 5.58, la forma de la isoterma de adsorción es sigmoideal, lo que sugiere la existencia de un efecto sinérgico en el que la adsorción de las primeras moléculas facilita la adsorción de las siguientes por la fuerte interacción intermolecular que se induce. Este modelo de adsorción se ha descrito en otros adsorbatos tales como biosurfactantes (n-dodecil- β -D-maltósido^[201, 202]), en donde se demuestra la existencia de una fuerte interacción entre las moléculas una vez adsorbidas. La interacción intermolecular existente en el PB podría ser debida a interacción por apilamiento de anillos bencénicos o bien por la interacción por puentes de H entre grupos carboxílicos, que estarían protonados a pH ácido.

Al estudiar los espectros SERS del PB frente a su concentración se observa que la intensidad relativa de las bandas se mantiene constante al aumentar el recubrimiento, es decir, no se han encontrado evidencias en los espectros SERS de las interacciones intermoleculares deducidas de la isoterma de adsorción.

5.5.2 Detección cuantitativa de sustancias de dopaje deportivo mediante SERS.

Una vez estudiada la adsorción de las SDD estudiadas sobre las nanopartículas plasmónicas empleadas en la detección SERS de estas sustancias, se ha procedido a llevar a cabo el último objetivo de este trabajo, es decir la aplicación de la técnica SERS en el análisis cuantitativo de sustancias de dopaje deportivo. A partir del análisis de las isotermas de adsorción es posible determinar las regiones de linealidad entre la señal

analítica (I_{SERS} , en este caso) y la concentración de analito ($[A]$). Por lo tanto, las isotermas de adsorción pueden ser consideradas como curvas de calibrado de I_{SERS} frente a $[A]$ para la detección de SDD sobre NPs plasmónicas. Los estudios de la sección anterior facilitan este último paso, pues el cálculo de K_{ad} requiere también una aproximación de carácter cuantitativo y estadístico. Así pues, los datos presentados en la sección 5.5.1 fueron empleados para la elaboración de las curvas de calibrado necesarias para llevar a cabo la detección.

A partir de las curvas de calibrado es necesario encontrar la región de linealidad (RL) para la relación $I_{\text{SERS}}/[A]$, comprendida entre el límite de detección (LD) y el límite de linealidad (LL). Esta región está situada normalmente dentro de una zona de concentraciones relativamente bajas, entre ppt y ppm (pg/mL y $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), dependiendo de cada sustancia. A partir de los valores $I_{\text{SERS}}/[A]$ se puede determinar el límite de detección, es decir la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada de manera fiable en unas condiciones determinadas^[86, 203]. El límite de linealidad está relacionado con el valor de la superficie total de adsorción disponible (STA) en los sistemas de nanopartículas empleados. Normalmente la RL se encuentra poco afectada por la agregación de las NPs, ya que la región entre ppt y ppm es suficientemente baja para que no ocurra una agregación significativa debida a la adsorción del compuesto. En estas condiciones se tiene que el valor de I_{SERS} se corresponde de manera proporcional con la cantidad de moléculas adsorbidas sobre la superficie.

En el caso de las SDD que se adsorben sobre NPs plasmónicas siguiendo un modelo de adsorción tipo Langmuir, se tiene la región de linealidad cuando la concentración de analito es muy baja. En estas condiciones se tiene que $K_{\text{ad}}[A] \ll 1$, por lo que la función de Langmuir aplicable a los datos SERS (Ecuación 4, pág. 125) puede simplificarse a la siguiente expresión:

$$I_S = K_{\text{ad}} \cdot I_{\text{sm}}[A] \quad (5)$$

La pendiente de esta recta representa la *sensibilidad* de la técnica SERS para una determinada sustancia, que depende directamente de la afinidad de la molécula de por la superficie (K_{ad}) y de la superficie total de adsorción disponible (que influye en el valor de I_{sm}). Estos dos factores son críticos en la aplicación de la técnica SERS en la detección de estas moléculas.

El límite de detección de cada SDD deducido a partir de los espectros SERS se obtuvo mediante la ecuación:

$$I_{LD} = I_0 + 3\sigma_0 \quad (6)$$

Siendo I_{LD} la intensidad de señal en el límite de detección, I_0 es la intensidad del blanco (coloide en las condiciones de medida y en ausencia del analito) y σ_0 es la desviación estándar del blanco^[203]. La concentración límite detectable (LD) se calculó sustituyendo el valor de I_{LD} en la recta de calibrado anterior (Ecuación 5).

A) Agonistas adrenérgicos β_2

Las rectas de calibrado empleadas para la detección de CB, SB y TB se muestran en la Figura 5.53. Los valores de los parámetros de adsorción calculados a partir de estos ajustes se muestran en la Tabla 5.8.

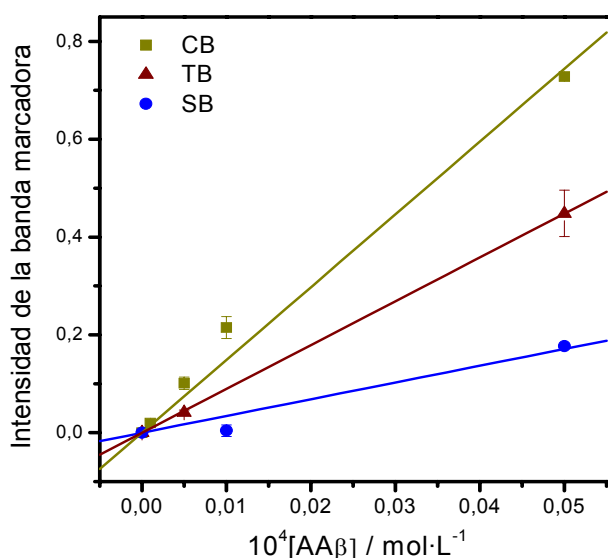


Figura 5.53. Ajuste lineal de la I_{SERS} frente a la concentración de AA β s en condiciones de baja concentración (10^{-8} – $5\cdot 10^{-6}$ M). Excitación a 785 nm

Tabla 5.8. Resultados del ajuste lineal a bajas concentraciones y LD obtenidos a partir de las isotermas de adsorción SERS de AA β .

	$10^4 K_{\text{ad}} \cdot I_{\text{sm}}$	r^2	LD ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Clembuterol	14.7 ± 7.2	0.995	35
Terbutalina	8.956 ± 0.050	0.9999	55
Salbutamol	3.42 ± 0.42	0.99	765

La sensibilidad de la técnica, es decir, la pendiente de la recta de calibrado, varía en el sentido $\text{CB} > \text{TB} > \text{SB}$, la cual depende de la afinidad de estos compuestos hacia el Au y la capacidad de adsorción de la superficie de las NPs de Au empleadas.

Los LD obtenidos en esta Tesis para la detección de estas sustancias sobre nanopartículas de oro son inferiores a los encontrados en la literatura empleando electroforesis capilar con detección UV-visible^[123]. En otros estudios, se han descrito mejores valores de LD pero mediante métodos que requieren el pretratamiento de la muestra, como el etiquetado de estas moléculas con un marcador luminiscente^[204], o preconcentración de la misma para mejorar la señal, al utilizar detección amperométrica^[205]. Otras técnicas que proporcionan información cualitativa y cuantitativa de los compuestos (mediante detección por espectrometría de masas) requieren también de complicados procesos de pretratamiento que no serían necesarios para su detección por SERS, y los LD alcanzados mediante estos métodos son del mismo orden que los presentados en este trabajo^[119, 206].

B) Aminoglutetimida

Las curvas de calibrado de la AGI en la región de linealidad se muestran en la Figura 5.54, para el caso de coloides AuCT, y en la Figura 5.55, para NPs de los coloides de AgCT y AgNPT. La separación entre metales está obligada por el hecho de emplear una banda de referencia diferente en los espectros de AGI sobre cada uno de los metales estudiados, debido a la diferente afinidad.

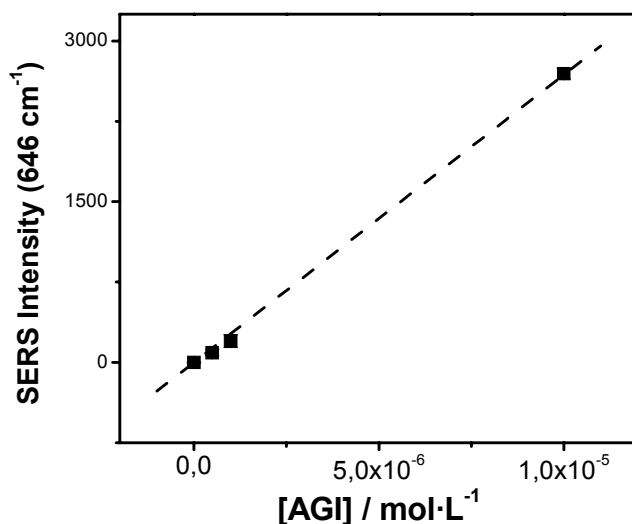


Figura 5.54. Ajuste lineal de la I_{SERS} de la banda marcadora de AGI en AuCT (647 cm^{-1}) frente a la concentración en la región de linealidad ($10^{-8} - 10^{-5} \text{ M}$). Excitación a 785 nm

El ajuste lineal conduce a la siguiente ecuación:

$$I_{\text{SERS}} = (2.685 \pm 0.048) \cdot 10^8 \cdot [\text{AGI}] \quad ; \quad r^2 = 0.9997 \quad (6)$$

El LD calculado a partir de esta ecuación es de 85 ng/mL. Lo que indica que la técnica SERS puede detectar la AGI usando NPs de Au con una mayor sensibilidad y LD mejor que los encontrados mediante otras técnicas como LC/MS, GC/MS, o CE con detección espectrofotométrica^[126, 207-209]. Todo ello con la ventaja adicional de una medición directa sin necesidad de pretratamiento y asegurando una detección altamente selectiva por tratarse de una banda marcadora característica de AGI.

En el caso de usar coloide de Ag, se tienen que la región de linealidad para $I_{\text{SERS}}/[\text{AGI}]$ se encuentra en el intervalo 10^{-8} - 10^{-7} M para el coloide AgCT y 10^{-9} - 10^{-8} M en el coloide AgNPT (Figura 5.55). Las ecuaciones derivadas del ajuste lineal son:

$$\text{AgCT: } I_{1606} = (7.4 \pm 0.4) \cdot 10^5 \cdot [\text{AGI}] + (2 \pm 2) \cdot 10^{-2}; r^2 = 0.994 \quad (7)$$

$$\text{AgNPT: } I_{1606} = (2.1 \pm 0.1) \cdot 10^6 \cdot [\text{AGI}] + (2.2 \pm 0.5) \cdot 10^{-2}; r^2 = 0.996 \quad (8)$$

Los LD deducidos para estos sustratos son 5.1 y 0.13 ng/mL, respectivamente; valores son más bajos que los encontrados en la bibliografía^[126, 128, 209-211].

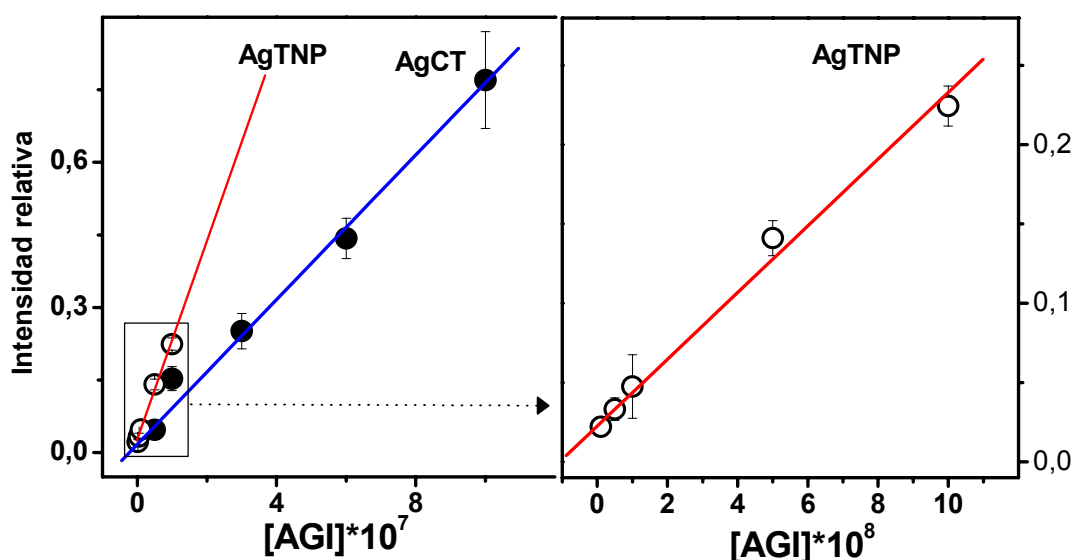


Figura 5.55. Variación de la banda SERS de la AGI a 1606 cm^{-1} en AgCT y AgNPT con la concentración de AGI en las regiones de linealidad de cada uno de estos sustratos y ajustes lineales derivados. Excitación a 632.8 nm

Comparativamente, la sensibilidad (estimada a partir de la pendiente de la curva de calibrado) y reproducibilidad (estimada por la desviación estándar de intensidades) de este método es mejor para el coloide AgNPT que para AgCT y AuCT. La mayor sensibilidad observada al emplear los nanoprismas triangulares se atribuye a las propiedades morfológicas de los mismos, que dan lugar a una intensidad SERS más alta debido a la adsorción de la AGI en los espacios interpartícula a concentraciones de sub-monocapa. Sin embargo, al completarse el recubrimiento superficial, la eficiencia SERS

de AgNPT está fuertemente limitada por la presencia de ión bromuro, que a su vez es necesario para el crecimiento de las nanopartículas con geometría triangular mediante este procedimiento. Por lo tanto, las propiedades de detección de AgNPT podrían mejorarse incrementando la superficie total de adsorción, p. e. eliminando los iones Br^- de la superficie o concentrando el número de nanopartículas en suspensión, sin llegar a una desestabilización del mismo.

C) Probenecid

Aunque la adsorción del PB sobre AgCT no sigue un modelo de Langmuir se ha encontrado también una relación lineal entre la I_{SERS} y la concentración de PB a bajas concentraciones del analito. En este caso la región de linealidad se encuentra en el intervalo $5 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-5} M. El ajuste lineal en esta región se muestra en la Figura 5.56, siendo la ecuación obtenida para la recta de regresión:

$$I_{\text{SERS}} = (1.3 \pm 0.2) \cdot 10^4 \cdot [\text{PB}] + (0.300 \pm 0.009) \quad r^2 = 0.95 \quad (9)$$

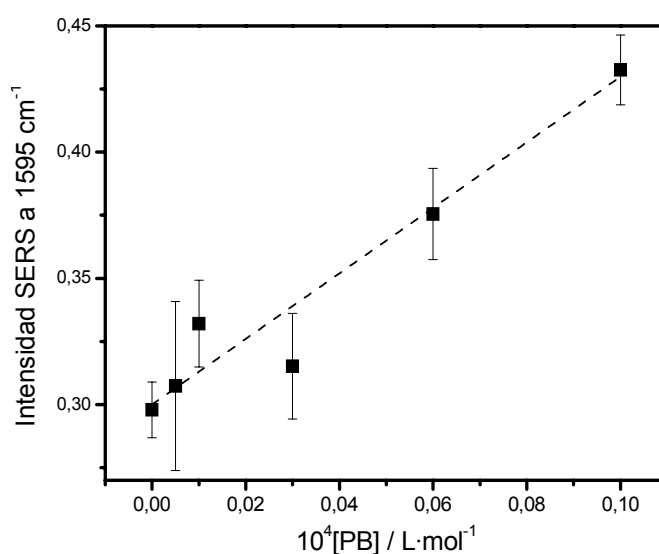


Figura 5.56. Ajuste lineal de I_{SERS} para la banda a 1595 cm^{-1} frente a la concentración de PB en la región de linealidad: $5 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-5} M. $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$

El valor de la pendiente, que representa la sensibilidad de la detección SERS de PB, resulta ser mucho más bajo que el de otras sustancias detectadas. Aunque no puede evaluarse el valor de la constante de adsorción, la competitividad del PB con los iones citrato por la superficie disponible de adsorción a pH 4.0 disminuye la sensibilidad de la técnica para la detección de esta molécula. El límite de detección del PB mediante esta técnica es de $1.2 \mu\text{g/mL}$, que es superado por las técnicas de GC/MS y LC/MS/MS, con

los que esta sustancia consigue ser detectada con una sensibilidad del orden del ppb [206, 212, 213]

D) Nandrolona

Como se ha visto en la sección 5.4.2, la ausencia de afinidad por los metales plasmónicos de NR hace necesaria la funcionalización de las NPs mediante DTCD para poder detectar una señal SERS de esta sustancia. El coloide de AgCT se empleó para llevar a cabo la detección mediante SERS de la NR en presencia de DTCD, por ser el sustrato que dio lugar a una respuesta óptima. El láser empleado para la excitación de los espectros SERS de NR fue en este caso fue de 532 nm.

El análisis cuantitativo de NR se realizó fijando la concentración de DTCD en el coloide a 10^{-3} M. Esta concentración dio lugar a una señal SERS de NR óptima, ya que permite asegurar un recubrimiento completo de las NPs, maximizando así el número de cavidades disponibles para el analito. La Figura 5.57 muestra la región de linealidad observada al representar la intensidad SERS de la banda $\nu\text{C}=\text{C}$ (1616 cm^{-1}) frente a la concentración total de NR, que corresponde al intervalo de concentraciones 10^{-7} - 10^{-6} M. El ajuste lineal de los valores de intensidad de esta banda frente a la concentración dio lugar a la ecuación siguiente:

$$I_{1616} = (2.5 \pm 0.2) \cdot 10^4 \cdot [\text{NR}] + (4.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-2} \quad r^2 = 0.998 \quad (10)$$

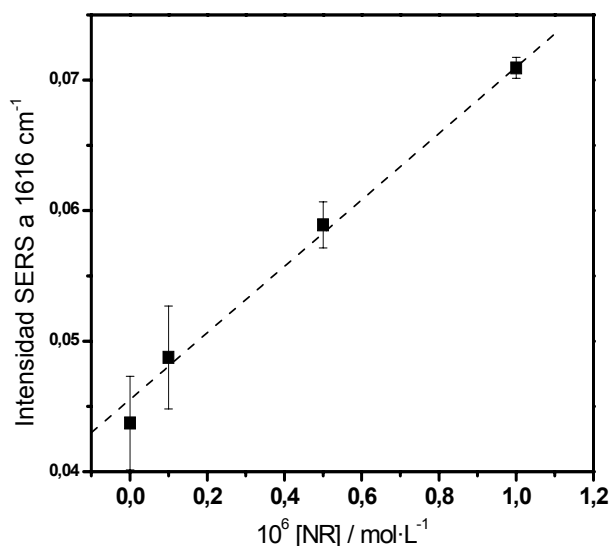


Figura 5.57. Variación de la intensidad de la banda de NR a 1616 cm^{-1} en función de la concentración del anabolizante y regresión lineal de los datos. Excitación a 532 nm.

El LD calculado mediante este procedimiento para NR resultó ser de 140 ng/mL (140 ppb). Por lo tanto, la técnica SERS no puede competir por el momento y con los

datos encontrados en esta Tesis con los métodos de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem, con los que se obtienen LD del orden de los pg/mL (es decir ~1 ppt) ^[214-218]. Aún así, el SERS sigue presentando la ventaja frente a esta técnica de su aplicabilidad directa, sin necesidad de pretratamiento de las muestras. Además, los resultados presentados en esta Tesis constituyen el primer paso hacia la búsqueda de un método de funcionalización que permita, en condiciones más adecuadas, rebajar la sensibilidad y el LD de este método en la detección de NR.

5.6. Results outline and comparative evaluation

Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic colloids as substrates was successfully applied for the detection of sport doping drugs. The influence of various factors on the SERS response of each target compound (namely clenbuterol, salbutamol, terbutaline, aminoglutethimide, probenecid and nandrolone) was studied in this work. Nanoparticle size, shape, nature of the metal, interphase composition and pH were all shown to have a role in the adsorption process and, therefore, in the SERS spectrum of each molecule.

These studies helped to optimize the measurement conditions for quantitative SERS sensing of sport doping drugs (SDD) and persistent pollutants. Top SERS intensities were obtained for the colloids and experimental conditions summarized in Table 5.9.

Table 5.9. Experimental conditions that lead to highest SERS intensities of all analytes studied in this Thesis

Compound	Colloid	Optimal conditions for SERS	$10^5 \cdot K_{ad} / L \cdot mol^{-1}$	LOD / ppb
CB	AuCT	Acidic pH (≈ 3)	$5.8 \pm 2,1$	35
SB	AuCT	Alkaline pH (≈ 8)	0.99 ± 0.34	765
TB	AuCT	Acidic pH (≈ 4)	4.41 ± 0.53	55
AGI	AuCT	Acidic pH (≈ 2)	2.5 ± 1.1	85
	AgHX	Alkaline pH (≈ 9)	Not calculated	--
	AgCT		7.20 ± 0.10	5.1
	AgTNP		150 ± 20	0.13
PB	AgHX AgCT	Acidic pH (≈ 3)	Not a Langmuir mechanism	1200
NR	AgCT	Functionalised by DTCD	Depends on DTCD	140
ALD	AgHX	Functionalised by DTX		

Table 5.9 shows how selective detection of a certain drug by SERS can be tuned by optimising the sensing conditions, which in turn depend on the adsorption process. This fact is most apparent in the case of the three beta agonists adsorbing on Au NPs, as

each molecule presents its characteristic optimal pH conditions depending on the kind of interaction taking place in the adsorption.

The functionalising molecules that were tested in this Thesis also showed different selectivity. Size of the created cavity, in addition to the new chemical properties conferred to the plasmonic surface (such as a lower polarity or aromaticity of the functionaliser), will determine the surface selectivity, thus limiting the number of compounds that may be detected. For this reason, Ag NPs functionalised with aliphatic dithiols were unsuccessful for the SDD sensing, but the newly synthesized 6-dithiocarbamic acid- β -cyclodextrin could be used to approach nandrolone molecules to these NPs giving rise to an effective sensing system for this molecule.

The influence of the NP morphology was clearly demonstrated for the case of AGI, for which a much higher limit of detection was deduced on triangular nanoparticles due to the higher intensification of the electromagnetic field predicted for this kind of structures.

Also, the sensitivity of the SERS technique depends on the effectiveness of the adsorption. This is evidenced in Table 5.9 as a correlation between the adsorption constants and the limits of detection can be found. In fact, those molecules displaying a stronger affinity towards the metallic surface could be detected at lower concentrations.

The plasmon resonance spectra of colloidal metallic nanoparticles can be registered by UV-visible spectroscopy of the suspension. This technique is also sensitive to the adsorption of SDDs, so it may be used for detection of those drugs adsorbing directly on the NPs. However, the sensitivity of SERS is much higher due to the large signal measured even at low surface coverage. In addition, other species present in the colloidal medium may cooperate in inducing aggregation, such as the OH⁻ anions on spherical Ag NPs. This limits seriously the selectivity of the plasmon resonance method.

6. CONCLUSIONS

The following conclusions can be withdrawn from the results of this Thesis:

1. **Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)**, specifically using metal nanoparticles in colloidal suspensions as substrates and performing macroscopic average measurements, can be considered a reliable and effective technique for sport doping drug analysis, as it meets all needs of drug identification and high sensitivity and selectivity. In this technique, **sensitivity** is due to the large field enhancement produced by the localized surface plasmon resonance in Ag and Au nanoparticles, while **selectivity** is due to the inherent specificity of the surfaces and drug identification can be achieved because a vibrational spectrum of the analyte is obtained.
2. The possibility of registering SERS spectra of an SDD depends on the enhancement produced by the **metal substrate** and on the **adsorption** of the drug on it. Thus, an appropriate choice of the metal colloid is a key step to optimize these two factors and increase the effectiveness of SERS for SDD detection.
3. Because of **selective affinity** of each molecule to the metal surface, a significant influence of the nature of the metal on the SERS response was found. In this manner, β AA drugs only can be detected on Au surfaces, while AGI and PB manifested a higher affinity for Ag.
4. When analyzing the same metal, the method employed for the preparation also played an important role in the SERS intensity, due to the different **surface chemistry** of each colloid in terms of zeta potential and presence of residual adsorbed species. These species may be strongly bonded to the metal, thus

limiting the available adsorption surface; or interact weakly, in which case they may be replaced by drug molecules with a higher affinity.

5. **Morphology of the nanoparticles** is a promising factor to control in order to increase sensitivity. Although the classical spherical nanoparticles are very active in the SERS intensification, triangular nanoparticles were proven to have a higher effectiveness as predicted by the theory. In contrast, nanocubes and nanocuboctahedrons have shown to have a reduced activity as SERS substrates due to the presence of a large amount of surfactants on their interface.
6. The SERS experiments with SDDs revealed that the adsorption is a key process that determined in a large extent the intensification. This adsorption depends on the nature of the metal and the adsorbate but also on the **pH** and the **surface coverage**. From the SERS spectra it was possible to deduce the **interaction mechanism** of the analyte and its **orientation**, which was very important to understand the interfacial process that lead to the SERS intensification.
7. The study of the **adsorption isotherms**, which govern the dependence of SERS intensity on the surface coverage, revealed that the adsorption of the investigated SDD followed a Langmuir model except for probenecid, which seems to follow a BET model. Non-linear fittings to a Langmuir-type equation depending on SERS intensity allowed the calculation of adsorption constants of SDDs on the NP surface.
8. In cases where the adsorption is low or negligible, **functionalization** represents a good strategy to stimulate it and, in consequence, increase the SERS intensity. In particular, detection of nanodrolone on Ag nanoparticles was possible upon functionalization of their surface with **6-dithiocarbamic acid- β -cyclodextrin**, which has been synthesised for the first time in this work.
9. The functionalization of nanoparticles by using **dithiols** was not effective in the detection of SDDs. However, this method can be successfully applied in the SERS detection of the pesticide **aldrin**.

10. In a quantitative study, SERS **limits of detection** were calculated from lineal regions at low concentrations. In general, it was found that the affinity of the SDD following a Langmuir model is very high, and the limit of detection can reach orders of magnitude **of ppm to ppt**, depending on the case.
11. The sensitivity of the quantitative detection of SDD by SERS depends on the affinity of the analyte for the surface, but also on the **total available surface** for the adsorption, which also determines the extent of the linearity region.
12. These limits of detection achieved using SERS are **comparable to** those reported by **other techniques** usually employed in the anti-doping analysis of SDD, such as mass spectrometry or capillary electrophoresis. However, the SERS technique has the advantage of the possibility of a direct analysis (as no pre-treatment of samples is required), large specificity of the analysis, and shorter times.
13. **Plasmon resonance** is a technique also sensitive to the adsorption of SDD, and to the amount of analyte adsorbed. However, the sensitivity provided by this technique is much lower than that found with SERS.
14. For all the above reasons, the SERS technique can be postulated as a promising technique with a large future in the analysis of sport doping drugs.

7. SUMMARY

Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is an extremely sensitive analytical technique based mainly on the giant electromagnetic enhancement induced by metal nanoparticles (NPs)^[6, 7, 37, 39, 40]. This enhancement is attributed to the localized surface plasmon resonance (LSPR) phenomenon that takes place when light at the characteristic plasma frequency of the LSP interacts with the NP surface^[20, 41]. Briefly, when situated within the proximity of a nanostructured plasmonic surface, a molecule will undergo a huge increase in the cross section of various optical spectroscopies; especially for Raman, which enlarges highly the sensitivity of this technique. The most commonly employed SERS substrates are metal NPs in suspension (colloids) or immobilized and distributed on a solid surface^[36]. Although the main interest in SERS remains in the fields of single molecule or few molecules detection^[8, 10, 68, 219, 220], there is a general acceptance that SERS can be sufficiently reliable and low cost to compete with established analytical techniques across a broad range of applications and sample types^[86, 221, 222].

We have developed in this Thesis several strategies to increase the applicability of SERS technique in the sensitive and selective detection of sport doping drugs (SDD). In a first approach, we have investigated the effect of the type of metal, interface composition, nanoparticle morphology and pH on the SERS response of molecules with affinity to plasmonic surfaces, in order to optimize the measurement conditions in a quantitative analysis. In a second approach, we have functionalised the nanoparticle surface with host molecules so as to allow the approximation of molecules with no affinity to it.

We have employed several silver and gold colloids of different size and shape fabricated by chemical reduction of ion salts^[55, 133-136]. To prepare the samples, host molecules, as well as analytes, were added to the colloid from stock solutions. The instrumentation handled in this Thesis includes Raman, IR and UV-visible

spectrometers, TEM and SEM microscopes, and a SMS instrument. Vibrational spectra of the drugs of interest were calculated by *ab initio* methods, using Gaussian 03, to better understand their molecular fingerprints and their adsorption mechanisms with the SERS study.

In the direct adsorption approach, a methodology was developed for the identification and quantification of various SDD, namely clenbuterol (CB), salbutamol (SB), terbutaline (PB), probenecid (PB) and aminoglutethimide (AGI). Briefly, after analyzing their vibrational spectra in depth, which involved a complete assignation of the IR and Raman bands of the compounds in the solid state based on DFT calculations, a scanning of the SERS response in diverse colloids was carried out. The colloid giving rise to the highest SERS signals was then chosen for a pH sweep. SERS spectra afforded information about the interaction mechanism and the orientation, as indicated for terbutaline in Figure 7.1.

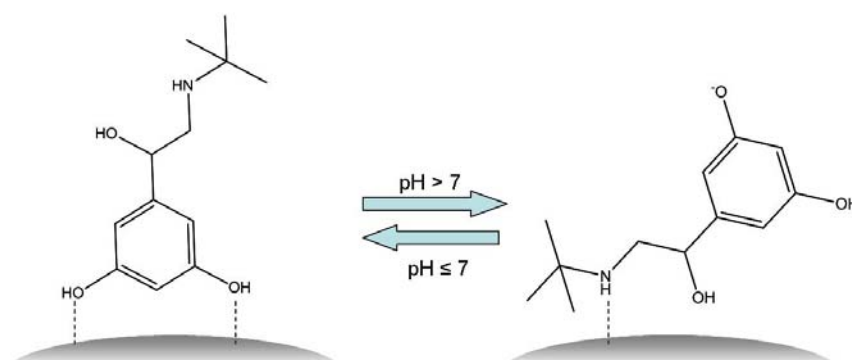


Figure 7.1. Representation of the adsorption process of terbutaline on Au NPs, as deduced from the SERS spectra

Afterwards, the adsorption isotherms were obtained and the adsorption parameters, i.e. the adsorption constant (K_{ad}), and the maximum registered intensity (I_{sm}) were calculated by plotting a characteristic marker band of the analyte against the drug concentration in the colloid. The adsorption mechanism deduced from the adsorption of the main part of drugs (CB, SB, TB and AGI) follows a Langmuir-like model, meaning that a negligible intermolecular interaction between adsorbate molecules occurs. At low concentration, a linear behaviour allowed the linear fitting of calibration curves and the evaluation of the technique sensitivity and limit of detection for each drug. These studies were compared to the results coming out from the analysis of the colloid aggregation by localized surface plasmon resonance (LSPR). The last

technique was demonstrated to be less sensitive to the adsorption and, hence, to the detection of drugs in comparison to SERS.

The problem of detecting molecules with little or no affinity to the plasmonic surfaces was overtaken employing two types of functionalising molecules. The newly synthesized 6-dithiocarbamic acid- β -cyclodextrin (DTCDH), obtained from the 6-monoamino derivative, was shown to present affinity to silver NPs while keeping its potential as host molecule. DTCD was successfully used for trace detection of nandrolone. On the other hand, linear α,ω -dithiols resulted to be interesting functionalisers as they combine two advantages: a) a change in the surface chemical properties; and b) creation of a large number of size controlled SERS hot spots.

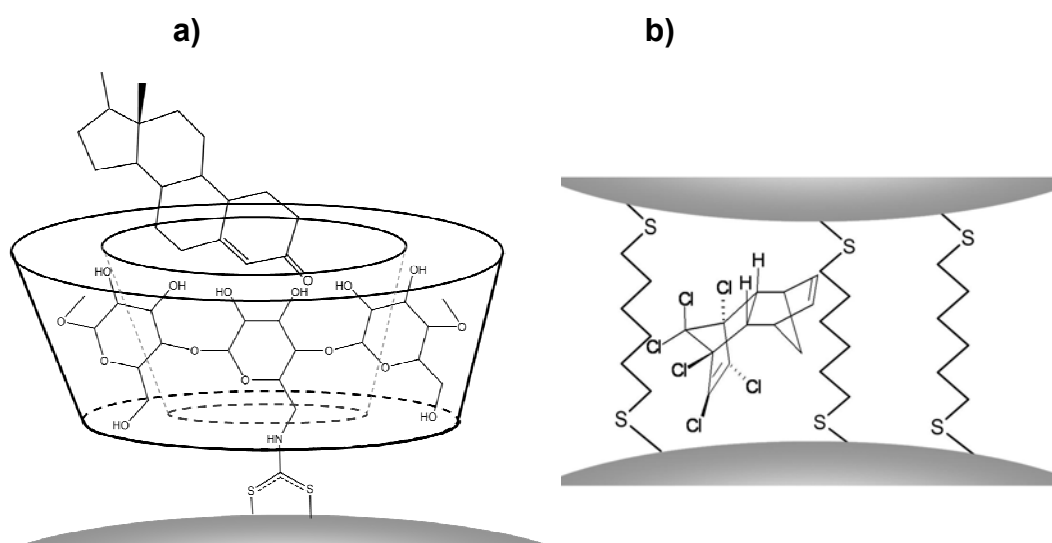


Figure 7.2. Nandrolone (a) and aldrin (b) occupying host spaces in functionalised surfaces.

Even though, the functionalization of nanoparticles by using dithiols was not effective in the detection of SDDs. However, this method can be successfully applied in the SERS detection of hydrophobic analytes, such as polichlorinated pesticides like the insecticide aldrin. They are also an appealing contribution to the field of plasmonics, as controlling the size of a hot spot is a way to control the localised plasmon resonance frequency. The adsorption of α,ω -dithiols on Ag NPs was studied by SERS. The effect on the colloidal structure was followed by UV-visible spectroscopy, TEM and spatial modulation spectroscopy. Correlation between spectroscopic measurements and TEM observations confirmed a controlled tuning of the interparticle distance as a function of chain length and surface coverage.

Judging on the results of this Thesis, it can be concluded that in order to apply SERS with analytical purposes, *selectivity* is the main factor to consider, as each molecule will demand its particular sensing conditions depending on its structure and properties. In case of using functionalising molecules, the size of the created cavity, in addition to the new chemical properties conferred to the plasmonic surface, will delineate selectivity. Finally, using *anisotropic* NP is a means for a higher sensitivity, as they show strong enhancement factors. However, the composition of the interface can be a drawback if the capping agents that induce anisotropic growth block the approach of other molecules to the NP surface.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Urban, M.W., *Vibrational spectroscopy of molecules and macromolecules on surfaces*. 3 ed, ed. I. John Wiley & Sons. 1993, New York.
2. Fleischmann, M., P.J. Hendra, and A.J. McQuillan, *Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode*. Chemical Physics Letters, 1974. **26**(2): p. 163-166.
3. Jeanmaire, D.L. and R.P. Van Duyne, *Surface Raman Spectroelectrochemistry. Part I: Heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1977. **84**: p. 1-20.
4. Le Ru, E.C. and P.G. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, ed. Elsevier. 2009, Oxford.
5. Creighton, J.A., C.G. Blatchford, and M.G. Albrecht, *Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2, 1979. **75**(0): p. 790-798.
6. Moskovits, M., *Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective*. Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(6-7): p. 485-496.
7. Schatz, G.C., *Theoretical Studies of Surface Enhanced Raman Scattering*. Accounts of Chemical Research, 1984. **17**: p. 370-376.
8. Kneipp, K., Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, and M.S. Feld, *Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)*. Physical Review Letters, 1997. **78**(9): p. 1667-1670.
9. Vlckova, B., M. Moskovits, I. Pavel, K. Siskova, M. Sladkova, and M. Slouf, *Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy from a molecularly-bridged silver nanoparticle dimer*. Chemical Physics Letters, 2008. **455**(4): p. 131-134.
10. Xu, H.X., E.J. Bjerneld, M. Kall, and L. Borjesson, *Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface-enhanced Raman scattering*. Physical Review Letters, 1999. **83**: p. 4357-4360.
11. Le Ru, E.C., P.G. Etchegoin, and M. Meyer, *Enhancement factor distribution around a single surface-enhanced Raman scattering hot spot and its relation to single molecule detection*. Journal of Chemical Physics, 2006. **125**(20): p. 204701-204714.
12. Halas, N.J., S. Lal, W.S. Chang, S. Link, and P. Nordlander, *Plasmons in strongly coupled metallic nanostructures*. Chemical Reviews, 2011.
13. Nordlander, P., C. Oubre, E. Prodan, K. Li, and M.I. Stockman, *Plasmon hybridization in nanoparticle dimers*. Nano Letters, 2004. **4**(5): p. 899-903.

14. Guerrini, L., J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, and S. Sanchez-Cortes, *Self-assembly of a dithiocarbamate calix[4] arene on Ag nanoparticles and its application in the fabrication of surface-enhanced Raman scattering based nanosensors*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. **11**(11): p. 1787-1793.
15. Guerrini, L., J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, and S. Sanchez-Cortes, *Nanosensors Based on Viologen Functionalized Silver Nanoparticles: Few Molecules Surface. Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Interparticle Hot Spots*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(4): p. 1418-1425.
16. Strickland, A.D. and C.A. Batt, *Detection of Carbendazim by Surface-Enhanced Raman Scattering Using Cyclodextrin Inclusion Complexes on Gold Nanorods*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(8): p. 2895-2903.
17. Urban, M.W., *Vibrational spectroscopy for molecules and macromolecules on surfaces*, ed. I. John Wiley & Sons. 1993, New York.
18. Stuart, B.H., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. 2004: John Wiley & Sons, Ltd.
19. Long, D.A., *The Raman effect: A unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*, ed. J.W. Sons. 2002.
20. Moreno, F., P. Albella, F. González, and B. García-Cámara, *Fundamentos de espectroscopía plasmónica con nanopartículas metálicas*, in *Plasmónica: Detección Sobre Nanoestructuras Metálicas*, C.d.E.d.I.S.E.d. Óptica, Editor. 2010: Madrid. p. 41-60.
21. Billaud, P., J.R. Huntzinger, E. Cottancin, J. Lerme, M. Pellarin, L. Arnaud, M. Broyer, N. Del Fatti, and F. Vallee, *Optical extinction spectroscopy of single silver nanoparticles*. European Physical Journal D, 2007. **43**(1-3): p. 271-274.
22. Kelly, K.L., E. Coronado, L.L. Zhao, and G.C. Schatz, *The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape and dielectric environment*. Journal of physical Chemistry B, 2003. **107**: p. 668-677.
23. Mulvaney, P., *Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles*. Langmuir, 1996. **12**: p. 788-800.
24. El-Sayed, M.A., *Small is different: shape-, size- and composition-dependent properties of some colloidal semiconductor nanocrystals*. Accounts of Chemical Research, 2004. **37**(5): p. 326-333.
25. Marhaba, S., G. Bachelier, C. Bonnet, M. Broyer, E. Cottancin, N. Grillet, J. Lerme, J.L. Vialle, and M. Pellarin, *Surface Plasmon Resonance of Single Gold Nanodimers near the Conductive Contact Limit*. Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(11): p. 4349-4356.
26. Le Ru, E.C. and P.G. Etchegoin, *Phenomenological local field enhancement factor distributions around electromagnetic hot spots*. Journal of Chemical Physics, 2009. **130**(18).
27. Kelly, K.L., E. Coronado, L.L. Zhao, and G.C. Schatz, *The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(668-677).
28. Sherry, L.J., R.C. Jin, C.A. Mirkin, G.C. Schatz, and R.P. Van Duyne, *Localized surface plasmon resonance spectroscopy of single silver triangular nanoprisms*. Nano Letters, 2006. **6**(9): p. 2060-2065.
29. Perez, A., P. Melinon, V. Dupuis, L. Bardotti, B. Masenelli, F. Tournus, B. Prevel, J. Tuauillon-Combes, E. Bernstein, A. Tamion, N. Blanc, D. Tainoff, O. Boisron, G. Guiraud, M. Broyer, M. Pellarin, N. Del Fatti, F. Vallee, E. Cottancin, J. Lerme, J.L. Vialle, C. Bonnet, P. Maioli, A. Crut, C. Clavier, J.L.

- Rousset, and F. Morfin, *Functional nanostructures from clusters*. International Journal of Nanotechnology, 2010. **7**(4-8): p. 523-574.
30. Guerrini, L., A.E. Aliaga, J. Carcamo, J.S. Gomez-Jeria, S. Sanchez-Cortes, M.M. Campos-Vallette, and J.V. Garcia-Ramos, *Functionalization of Ag nanoparticles with the bis-acridinium lucigenin as a chemical assembler in the detection of persistent organic pollutants by surface-enhanced Raman scattering*. Analytica Chimica Acta, 2008. **624**(2): p. 286-293.
 31. Guerrini, L., J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, and S. Sanchez-Cortes, *Building highly selective hot spots in Ag nanoparticles using bifunctional viologens: Application to the SERS detection of PAHs*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(20): p. 7527-7530.
 32. Cho, E.C., S.W. Choi, P.H.C. Camargo, and Y. Xia, *Thiol-induced assembly of Au nanoparticles into chainlike structures and their fixing by encapsulation in silica shells or gelatin microspheres*. Langmuir, 2010. **26**(12): p. 10005-10012.
 33. Fleischm.M, P.J. Hendra, and McQuilla.Aj, *RAMAN-SPECTRA OF PYRIDINE ADSORBED AT A SILVER ELECTRODE*. Chemical Physics Letters, 1974. **26**(2): p. 163-166.
 34. Haynes, C.L., A.D. McFarland, and R.C. Van Duyne, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2005: p. 338A-346A.
 35. Creighton, J.A., C.G. Blatchford, and M.G. Albrecht, Journal of the Chemical Society: Faraday Transitions II, 1979. **75**: p. 790.
 36. Aroca, R.F., R.A. Alvarez-Puebla, N. Pieczonka, S. Sanchez-Cortes, and J.V. Garcia-Ramos, *Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures*. Advances in Colloid and Interface Science, 2005. **116**: p. 45-61.
 37. Otto, A., I. Mrozek, H. Grabhorn, and W. Akemann, *SURFACE-ENHANCED RAMAN-SCATTERING*. Journal of Physics-Condensed Matter, 1992. **4**(5): p. 1143-1212.
 38. Moskovits, M., *Surface selection rules*. Journal of Chemical Physics, 1982. **77**(9): p. 4408-4416.
 39. Moskovits, M., *Surface-enhanced spectroscopy*. Reviews of Modern Physics, 1985. **57**(3): p. 783-826.
 40. Aroca, R., *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*. 2006, Chichester John Wiley & Sons
 41. Schatz, G.C., M.A. Young, and R.P. Van Duyne, *Electromagnetic Mechanism of SERS*.
 42. Wokaun, A., *Surface enhancement of optical fields: Mechanism and applications*. Molecular Physics, 1985. **56**(1): p. 1-33.
 43. Kovacs, G.J., R.O. Loutfy, P.S. Vincett, C. Jennings, and R. Aroca, *Distance Dependence of Sers Enhancement Factor from Langmuir-Blodgett Monolayers on Metal Island Films - Evidence for the Electromagnetic Mechanism*. Langmuir, 1986. **2**(6): p. 689-694.
 44. Murray, C.A. and D.L. Allara, *Measurement of the Molecule Silver Separation Dependence of Surface Enhanced Raman-Scattering in Multilayered Structures*. Journal of Chemical Physics, 1982. **76**(3): p. 1290-1303.
 45. Creighton, J.A., *The selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy*, in *Spectroscopy of Surfaces*. 1988, John Wiley & Sons: New York.
 46. Lopez-Tocon, I., S.P. Centeno, J.C. Otero, and J.I. Marcos, *Selection rules for the charge transfer enhancement mechanism in SERS: dependence on the intensities of the L-matrix*. Journal of Molecular Structure, 2001. **565-566**: p. 369-372.

47. Wu, D.Y., X.M. Liu, S. Duan, X. Xu, B. Ren, S.H. Lin, and Z.Q. Tian, *Chemical Enhancement Effects in SERS Spectra: A Quantum Chemical Study of Pyridine Interacting with Copper, Silver, Gold and Platinum Metals*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**: p. 4195-4204.
48. Polubotko, A.M., *Strong Quadrupole Interaction of Light with Molecules and Its Manifestation in Surface-Enhanced Hyper-Raman Scattering Spectra* Optics and Spectroscopy, 2010. **109**(4): p. 510-520.
49. Sanchez-Cortes, S., J.V. Garcia-Ramos, and G. Morcillo, *Morphological Study of Metal Colloids Employed as Substrate in the SERS Spectroscopy*. Journal of Colloid and Interface Science, 1994. **167**: p. 428-436.
50. Sanchez-Cortes, S., J.V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, and A. Tinti, *Morphological Study of Silver Colloids Employed in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Activation when Exciting in Visible and Near-Infrared Regions*. Journal of Colloid and Interface Science, 1995. **175**: p. 358-368.
51. Haynes, C.L. and R.P. Van Duyne, *Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics*. Journal of Physical Chemistry B, 2001. **105**: p. 5599-5611.
52. Nie, S. and S.R. Emory, *Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering*. Science, 1997. **275**: p. 1102-1106.
53. Kneipp, K., H. Kneipp, I. Itzkan, R. Dasari, and M.S. Feld, *Chemical Reviews*, 1999. **99**: p. 2957.
54. Goulet, P.J.G., N. Pieczonka, and R.F. Aroca, *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(1918-1923).
55. Lee, P.C. and D. Meisel, *Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*. Journal of Physical Chemistry, 1982. **86**(17): p. 3391-3395.
56. Leopold, N. and B. Lendl, *A new method for fast preparation of highly Surface-Enhanced Raman scattering active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(24): p. 5723-5727.
57. Frens, G., *Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions*. Nature Physical Science, 1973. **241**: p. 20-22.
58. Sun, Y.G. and Y.N. Xia, *Triangular nanoplates of silver: synthesis, characterization, use as sacrificial templates for generating triangular nanorings of gold*. Advanced Materials, 2003. **15**(9): p. 695-699.
59. Millstone, J.E., S.J. Hurst, G.S. Metraux, J.I. Cutler, and C.A. Mirkin, *Colloidal gold and silver triangular nanoprisms*. Small, 2009. **5**(6): p. 646-664.
60. Au, L., Y.C. Chen, F. Zhou, P.H.C. Camargo, B. Lim, Z.Y. Li, D.S. Ginger, and Y.A. Xia, *Synthesis and Optical Properties of Cubic Gold Nanoframes*. Nano Research, 2008. **1**(6): p. 441-449.
61. Esenturk, E.N. and A.R. Haight-Walker, *Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy via gold nanostars*. Journal of Raman Spectroscopy, 2009. **40**(1): p. 86-91.
62. Guerrini, L., Z. Jurasekova, C. Domingo, M. Perez-Mendez, P. Leyton, M. Campos-Vallette, J.V. Garcia-Ramos, and S. Sanchez-Cortes, *Importance of metal-adsorbate interactions for the surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on plasmonic nanoparticles*. Plasmonics, 2007. **2**(3): p. 147-156.
63. Israelachvili, J.L., *Intermolecular and Surface Forces*, ed. A. Press. 1985, New York.

64. Brunauer, S., P.H. Emmet, and E. Teller, *Adsorption of gases in multimolecular layers*. Journal of the American Chemical Society, 1938. **60**(2): p. 309-319.
65. Brunauer, S., L.S. Deming, W.S. Deming, and E. Teller, *On a theory of the Van der Waals adsorption of gases*. Journal of the American Chemical Society, 1940. **42**(7): p. 1723-1732.
66. Garcia-Ramos, J.V., C. Domingo, L. Guerrini, P. Leyton, M. Campos-Vallette, and S. Sanchez-Cortes, *Plasmonic metal nanoparticle functionalization for selective sensing of persistent pollutants by surface-enhanced Raman scattering*. Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy, 2007. **52**(3): p. 186-197.
67. Sanchez-Cortes, S. and L. Guerrini, *Espectroscopía Raman intensificada por superficies nanoestructuradas de naturaleza plasmónica (SERS)*, in *Plasmónica: Detección sobre nanoestructuras metálicas*, P. Sevilla, Editor. 2010, Sociedad Española de Óptica: Madrid. p. 99-124.
68. Constantino, C.J.L., T. Lemma, P.A. Antunes, and R.F. Aroca, *Single-Molecule Detection Using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering and Langmuir–Blodgett Monolayers*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(15): p. 3674-3678.
69. Futamata, M., *Single molecule sensitivity in SERS: importance of junction of adjacent Ag nanoparticles*. Faraday Discussions, 2006. **132**: p. 45-61.
70. Li, J.F., Y.F. Huang, Y. Ding, Z.L. Yang, S.B. Li, X.S. Zhou, F.R. Fan, W. Zhang, Z.Y. Zhou, D.Y. Wu, B. Ren, Z.L. Wang, and Z.Q. Tian, *Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy*. Nature, 2010. **464**: p. 392-395.
71. Guerrini, L., I. Izquierdo-Lorenzo, R. Rodriguez-Oliveros, J.A. Sanchez-Gil, S. Sanchez-Cortes, J.V. Garcia-Ramos, and C. Domingo, *α,ω -aliphatic diamines as molecular linkers for engineering Ag nanoparticle clusters: tuning of the interparticle distance and sensing application*. Plasmonics, 2010. **5**: p. 273-286.
72. Guerrini, L., J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, and S. Sanchez-Cortes, *Functionalization of Ag nanoparticles with dithiocarbamate calix[4]arene as an effective supramolecular host for the surface-enhanced Raman scattering detection of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Langmuir, 2006. **22**(26): p. 10924-10926.
73. Alvarez-Puebla, R.A. and L.M. Liz-Marzan, *Environmental applications of plasmon assisted Raman scattering*. Energy & Environmental Science, 2010. **3**: p. 1001-1017.
74. Zhang, X.Y., M.A. Young, O. Lyandres, and R.P. van Duyne, *Rapid detection of an anthrax biomarker by surface-enhanced Raman spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(12): p. 4484-4489.
75. Grubisha, D.S., R.J. Lypert, H.Y. Park, J. Driskell, and M.D. Porter, *Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels*. Analytical Chemistry, 2003. **75**: p. 5936-5943.
76. Shafer-Peltier, K.E., C.L. Haynes, M.R. Glucksberg, and R.P. van Duyne, *Towards a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**: p. 588-593.
77. Yonzon, C.R., C.L. Haynes, X.Y. Zhang, J.T. Walsh, and R.P. Van Duyne, *A glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering: improved partition layer, temporal stability, reversibility and resistance to serum protein interference*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(1): p. 78-85.

78. Bao, L., S.M. Mahurin, and S. Dai, *Controlled layer-by-layer formation of ultrathin TiO₂ on silver island films via a surface sol-gel method for surface-enhanced Raman scattering measurements*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**: p. 6614-6620.
79. del Puerto, E., S. Sanchez-Cortes, J.V. Garcia-Ramos, and C. Domingo, *Solution SERS of an insoluble synthetic organic pigment-quinacridone quinone-employing calixarenes as dispersive cavitands*. *Chemical Communications*, 2011. **47**(6): p. 1854-1856.
80. Jarvis, R.M., A. Brooker, and R. Goodacre, *Surface-enhanced Raman spectroscopy for bacterial discrimination utilizing a scanning electron microscope with a Raman spectroscopy interface*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(17): p. 5198-5202.
81. Culha, M., D. Stokes, L.R. Allain, and T. Vo-Dinh, *Surface-enhanced Raman scattering substrate based on self-assembled monolayers for use in gene diagnostics*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(22): p. 6196-6201.
82. Mulvaney, S.P., M.D. Musick, C.D. Keating, and M.J. Natan, *Glass-coated, analyte-tagged nanoparticles: a new tagging system based on detection with surface-enhanced Raman scattering*. *Langmuir*, 2003. **19**(11): p. 4784-4790.
83. Doering, W.E. and S.M. Nie, *Spectroscopic tags using dye-embedded nanoparticles and surface-enhanced Raman scattering*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(22): p. 6171-6176.
84. Cao, Y.C., R. Jin, and C.A. Mirkin, *Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection*. *Science*, 2002. **297**: p. 1536-1540.
85. Hargreaves, M.D., K. Page, T. Munshi, R. Tomsett, G. Lynch, and H.G.M. Edwards, *Analysis of seized drugs using portable Raman spectroscopy in an airport environment: a proof of principle study*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2008. **39**: p. 873-880.
86. Bell, S.E.J. and N.M.S. Sirimuthu, *Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy*. *Chemical Society Reviews*, 2008. **37**: p. 1012-1024.
87. Leyton, P., S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette, C. Domingo, C. Saitz, and J.V. Garcia-Ramos, *Surface-Enhanced Micro-Raman Detection and Characterization of Calix[4]Arene-Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Host-Guest Complexes* *Applied Spectroscopy*, 2005. **59**(8): p. 1009-1015.
88. Leyton, P., S. Sanchez-Cortes, J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, M. Campos-Vallette, C. Saitz, and R.E. Clavijo, *Selective molecular recognition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on calix-4-arene-functionalized Ag nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(45): p. 17484-17490.
89. Zhao, Y., W. Perez-Segarra, Q. Shi, and A. Wei, *Dithiocarbamate Assembly on Gold*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**: p. 7328-7329.
90. Guerrini, L., J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, and S. Sanchez-Cortes, *Sensing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Dithiocarbamate-Functionalized Ag Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(3): p. 953-960.
91. Guerrini, L., I. Izquierdo-Lorenzo, J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, and S. Sanchez-Cortes, *Self-assembly of α,ω aliphatic diamines on Ag nanoparticles as an effective localized surface plasmon nanosensor based in interparticle hot spots*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009. **11**: p. 7363-7371.
92. Jones, C.L., K.C. Bantz, and C.L. Haynes, *Partition layer-modified substrates for reversible surface-enhanced Raman scattering detection of polycyclic*

- aromatic hydrocarbons*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **394**: p. 303-311.
93. Chen, J.I.L., Y. Chen, and D.S. Ginger, *Plasmonic Nanoparticle Dimers for Optical Sensing of DNA in Complex Media*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(28): p. 9600-9601.
94. Xie, Y.F., X. Wang, X.X. Han, W. Song, W.D. Ruan, J.Q. Liu, B. Zhao, and Y. Ozaki, *Selective SERS detection of each polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in a mixture of five kinds of PAHs*. Journal of Raman Spectroscopy, 2011. **42**(5): p. 945-950.
95. Bowers, L.D., *The analytical chemistry of drug monitoring in athletes*. Annual Reviews in Analytical Chemistry 2009. **2**: p. 485-507.
96. Agency, W.A.-D., *The 2011 Prohibited List - International Standard*. 2011.
97. Becchi, M., R. Aguilera, Y. Farizon, M.M. Flament, H. Casabianca, and P. James, *Gas chromatography/ combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1994. **8**: p. 304-308.
98. Bowers, L.D. and Sanaullah, *Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 1996. **687**: p. 61-68.
99. Liu, C.L. and L.D. Bowers, *Immunoaffinity trapping of urinary human chorionic gonadotropin and its high-performance liquid chromatographic–mass spectrometric confirmation*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 1996. **687**: p. 213-220.
100. Bredehöft, M., W. Schänzer, and M. Thevis, *Quantification of human insulin-like growth factor–1 and qualitative detection of its analogues in plasma using liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**: p. 477-485.
101. Mazzanti, G., C. Daniele, G. Boatto, G. Manca, G. Brambilla, and A. Loizzo, *New b-adrenergic agonists used illicitly as growth promoters in animal breeding: chemical and pharmacodynamic studies*. Toxicology, 2003. **187**: p. 91-99.
102. *Boletín Oficial del Estado*. 2011. p. 42603-42608.
103. Ali, H.R.H., H.G.M. Edwards, J. Kendrick, and I.J. Scowen, *Vibrational spectroscopic study of terbutaline hemisulphate*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2009. **72**(4): p. 715-719.
104. Ali, H.R.H., H.G.M. Edwards, M.D. Hargreaves, T. Munshi, I.J. Scowen, and R.J. Telford, *Vibrational spectroscopic characterisation of salmeterol xinafoate polymorphs and a preliminary investigation of their transformation using simultaneous in situ portable Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry*. Analytica Chimica Acta, 2008. **620**(1-2): p. 103-112.
105. Gale, K.E., J.W. Andersen, D.C. Tormey, E.G. Mansour, T.E. Davis, J. Horton, J.M. Wolter, T.J. Smith, and F.J. Cummings, *Hormonal Treatment for Metastatic Breast-Cancer - An Eastern Cooperative Oncology Group- Phase III - Trial Comparing Aminoglutethimide to tamoxifen*. Cancer, 1994. **73**(2): p. 354-361.
106. Cocconi, G., *First generation aromatase inhibitors - aminoglutethimide and testololactone*. Breast Cancer Research and Treatment, 1994. **30**(1): p. 57-80.
107. Glice, M.M., K. Bajdor, A. Les, T. Stepanenko, M.J. Nowak, H.Y. Aboul-Enein, and Z. Chilmonczyk, *Vibrational spectroscopy of cyclohexylaminoglutethimide*

- in low-temperature matrices, solutions and the solid state*. Journal of Molecular Structure, 2001. **560**(1-3): p. 137-149.
108. Glice, M.M., A. Les, and K. Bajdor, *IR, Raman and theoretical ab initio RHF study of aminoglutethimide - an anticancer drug*. Journal of Molecular Structure, 1998. **450**(1-3): p. 141-153.
109. Gleixner, A., H. Sauerwein, and H.H.D. Meyer, *Effects of drugs which influence renal transport systems on the urinary excretion of the beta(2)-adrenoceptor agonist clenbuterol and the anabolic steroids ethinylestradiol and methyltestosterone*. Food Additives and Contaminants, 1997. **14**(2): p. 143-150.
110. *The 2012 Prohibited List International Standard*, T.W.A.-D. Agency, Editor. 2012.
111. Brueggemeier, R.W., *Sex Hormones (Male): Analogs and Antagonists* 2005, Columbus: The Ohio State University.
112. Fragkaki, A.G., Y. Angelis, and M. Koupparis, *Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities*. Steroids, 2009. **74**: p. 1172-1197.
113. *Clarification about nandrolone testing*, W.A.-D. Agency, Editor. 2005.
114. *The World Antidoping Code - Internatinal Standard for Laboratories*, T.W.A.-D. Agency, Editor. 2012: Montreal, Quebec.
115. Brambilla, G., S. di Bez, D. Pietraforte, M. Minetti, L. Campanella, and A. Loizzo, *Ex vivo formation of gastric metabolites of clenbuterol: Preliminary characterisation of their chemical structure*. Analytica Chimica Acta, 2007. **586**: p. 426-431.
116. Brunelli, C., C. Bicchi, A. Di Stilo, A. Salomone, and M. Vincenti, *High-speed gas chromatography in doping control: Fast-GC and fast-GC/MS determination of beta-adrenoceptor ligands and diuretics*. Journal of Separation Science, 2006. **29**(18): p. 2765-2771.
117. Ticehurst, M.D., R.C. Rowe, and P. York, *Determination of the surface properties of two batches of salbutamol sulphate by inverse gas chromatography*. International Journal of Pharmaceutics, 1994. **111**: p. 241-249.
118. Leysens, L., C. Driessen, A. Jacobs, J. Czech, and J. Raus, *Determination of beta-2-receptor agonists in bovine urine and liver by gas chromatography tandem mass-spectrometry*. Journal of Chromatography: Biomedical Applications, 1990. **564**(2): p. 515-527.
119. Huang, J.F., H.J. Zhang, B. Lin, Q.W. Yu, and Y.Q. Feng, *Multiresidue analysis of beta-agonists in pork by coupling polymer monolith microextraction to electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(17): p. 2895-2904.
120. Huang, L., J.M. Lin, L.S. Yu, L.J. Xu, and G.N. Chen, *Improved simultaneous enantioseparation of beta-agonists in CE using beta-CD and ionic liquids*. Electrophoresis, 2009. **30**(6): p. 1030-1036.
121. Damasceno, L., R. Ventura, J. Ortuno, and J. Segura, *Derivatization procedures for the detection of beta(2)-agonists by gas chromatographic/mass spectrometric analysis*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(11): p. 1285-1294.
122. Bakhtiar, R. and F.L.S. Tse, *High-throughput chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2000. **14**(16): p. 1128-1135.

123. Sirichai, S. and P. Khanatharana, *Rapid analysis of clenbuterol, salbutamol, procaterol, and fenoterol in pharmaceuticals and human urine by capillary electrophoresis*. *Talanta*, 2008. **76**(5): p. 1194-1198.
124. Armstrong, D.W., K. Rundlett, and G.L. Reid, *Use of a Macrocyclic Antibiotic, Rifamycin B, and Indirect Detection for the Resolution of Racemic Amino Alcohols by CE*. *Analytical Chemistry*, 1994. **66**(10): p. 1690-1695.
125. Tan, Y.K. and S.J. Soldin, *Analysis of salbutamol enantiomers in human urine by chiral high-performance liquid-chromatography and preliminary studies related to the stereoselective disposition kinetics in man*. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*, 1987. **422**: p. 187-195.
126. Mareck, U., G. Sigmund, G. Opfermann, H. Geyer, and W. Schanzer, *Identification of the aromatase inhibitor aminoglutethimide in urine by gas chromatography/mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002. **16**(24): p. 2209-2214.
127. Anigbogu, V.C., C.L. Copper, and M.J. Sepaniak, *Separation of stereoisomers of aminoglutethimide using 3 capillary electrophoretic techniques*. *Journal of Chromatography A*, 1995. **705**(2): p. 343-349.
128. Elbashir, A.A., F.E.O. Suliman, B. Saad, and H.Y. Aboul-Enein, *Determination of aminoglutethimide enantiomers in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis using methylated-beta-cyclodextrin as a chiral selector and computational calculation for their respective inclusion complexes*. *Talanta*, 2009. **77**(4): p. 1388-1393.
129. Jurasekova, Z., C. Domingo, J.V. Garcia-Ramos, and S. Sanchez-Cortes, *In situ detection of flavonoids in weld-dyed wool and silk textiles by surface-enhanced Raman scattering*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2008. **39**(10): p. 1309-1312.
130. Cai, W., T. Sun, P. Liu, C. Chipot, and X. Shao, *Inclusion Mechanism of Steroid Drugs into beta-Cyclodextrins. Insights from Free Energy Calculations*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2009. **113**(22): p. 7836-7843.
131. Khomutov, S. and M.V. Donova, *Nanodimer cyclodextrin ligands with high affinity to steroids*. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2011. **70**(3-4): p. 353-357.
132. M. J. Frisch, G.W.T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, *Gaussian 03*. 2004, Gaussian, Inc: Wallingford CT.
133. Leopold, N. and 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*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003. **107**(24): p. 5723-5727.
134. Cathcart, N., A.J. Frank, and V. Kitaev, *Silver nanoparticles with planar twinned defects: effect of halides for precise tuning of plasmon resonance*

- maxima from 400 to > 900 nm*. Chemical Communications, 2009(46): p. 7170-7172.
135. Frens, G., *Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspension*. Nature Physical Sciences, 1973. **241**: p. 20-22.
136. Sau, T.K. and C.J. Murphy, *Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(28): p. 8648-8649.
137. Wong, R. and S.J. Dolman, *Isothiocyanates from tosyl chloride mediated decomposition of in situ generated dithiocarbamic acid salts*. Journal of Organic Chemistry, 2007. **72**: p. 3969-3971.
138. Becke, A.D., *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. Journal of Chemical Physics, 1993. **98**: p. 5648-5652.
139. Hohenberg, P. and W. Kohn, *Inhomogeneous electron gas*. Physical Reviews, 1964. **136**: p. B864.
140. Kohn, W. and L.J. Sham, *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*. Physical Reviews, 1965. **140**: p. A1133.
141. McLean, A.D. and G.S. Chandler, *Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11-18*. Journal of Chemical Physics, 1980. **72**(10): p. 5639-5348.
142. Krishnan, R., J.S. Binkley, R. Seeger, and J.A. Pople, *Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions*. Journal of Chemical Physics, 1980. **72**(1): p. 650-654.
143. Shen, A.G., L.F. Chen, W. Xie, J.C. Hu, A. Zeng, R. Richards, and J.M. Hu, *Triplex Au-Ag-C Core Shell Nanoparticles as a Novel Raman Label*. Advanced Functional Materials, 2010. **20**(6): p. 969-975.
144. Radziuk, D.V., W. Zhang, D. Shchukin, and H. Mohwald, *Ultrasonic Alloying of Preformed Gold and Silver Nanoparticles*. Small, 2010. **6**(4): p. 545-553.
145. Mukherjee, P. and A.K. Nandi, *Bimetallic Au-core-Ag-shell nanoparticles from interfacial redox process using poly(o-methoxyaniline)*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **344**(1): p. 30-36.
146. Lu, X.M., M. Rycenga, S.E. Skrabalak, B.J. Wiley, and Y.N. Xia, *Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles*. Annual Review of Physical Chemistry, 2009. **60**: p. 167-192.
147. Kumar, G.V.P., *Surface-enhanced Raman scattering studies of carbon nanotubes using Ag-core Au-shell nanoparticles*. Journal of Raman Spectroscopy, 2009. **40**(12): p. 2069-2073.
148. Kim, J.H., T. Kang, S.M. Yoo, S.Y. Lee, B. Kim, and Y.K. Choi, *A well-ordered flower-like gold nanostructure for integrated sensors via surface-enhanced Raman scattering*. Nanotechnology, 2009. **20**(23).
149. Hrelescu, C., T.K. Sau, A.L. Rogach, F. Jackel, and J. Feldmann, *Single gold nanostars enhance Raman scattering*. Applied Physics Letters, 2009. **94**(15).
150. Xue, C., G.S. Metraux, J.E. Millstone, and C.A. Mirkin, *Mechanistic study of photomediated triangular silver nanoprism growth*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(26): p. 8337-8344.
151. Xiao, S.H., N.A. Mortensen, and A.P. Jauho, *Nanostructure design for surface-enhanced Raman spectroscopy - prospects and limits*. Journal of the European Optical Society-Rapid Publications, 2008. **3**.
152. An, J., B. Tang, X.L. Zheng, J. Zhou, F.X. Dong, S.P. Xu, Y. Wang, B. Zhao, and W.Q. Xu, *Sculpturing effect of chloride ions in shape transformation from*

- triangular to discal silver nanoplates*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(39): p. 15176-15182.
153. Aherne, D., D.M. Ledwith, M. Gara, and J.M. Kelly, *Optical properties and growth aspects of silver nanoprisms produced by a highly reproducible and rapid synthesis at room temperature*. Advanced Functional Materials, 2008. **18**(14): p. 2005-2016.
154. Wiley, B.J., Y. Xiong, Z.Y. Li, Y. Yin, and Y.N. Xia, *Right bipyramids of silver: A new shape derived from twin seeds*. Nano Letters, 2006. **6**(4): p. 765-768.
155. Wang, Y.L., P.H.C. Camargo, S.E. Skrabalak, H.C. Gu, and Y.N. Xia, *A Facile, Water-Based Synthesis of Highly Branched Nanostructures of Silver*. Langmuir, 2008. **24**(20): p. 12042-12046.
156. Li, W.Y., P.H.C. Camargo, X.M. Lu, and Y.N. Xia, *Dimers of Silver Nanospheres: Facile Synthesis and Their Use as Hot Spots for Surface-Enhanced Raman Scattering*. Nano Letters, 2009. **9**(1): p. 485-490.
157. Qiu, T., W.J. Zhang, and P.K. Chu, *Aligned silver nanorod arrays for surface-enhanced Raman spectroscopy*. Physica B-Condensed Matter, 2009. **404**(8-11): p. 1523-1526.
158. Perez, A., P. Melinon, V. Dupuis, L. Bardotti, B. Masenelli, F. Tournus, B. Prevel, J. Tuauillon-Combes, E. Bernstein, A. Tamion, N. Blanc, D. Tainoff, O. Boisson, G. Guiraud, M. Broyer, M. Pellarin, N. Del Fatti, F. Vallee, E. Cottancin, J. Lerme, J.L. Vialle, C. Bonnet, P. Maioli, A. Crut, C. Clavier, J.L. Rousset, and F. Morfin, *Functional nanostructures from clusters*. International Journal of Nanotechnology, 2011. **7**(4-8): p. 523-574.
159. Zuloaga, J., E. Prodan, and P. Nordlander, *Quantum Description of the Plasmon Resonances of a Nanoparticle Dimer*. Nano Letters, 2009. **9**(2): p. 887-891.
160. Mie, G., Annalen der Physik, 1905. **25**: p. 377.
161. Siiman, O. and H. Feilchenfeld, *Internal fractal structure of aggregates of silver nanoparticles and its consequences on surface-enhanced Raman scattering intensities*. Journal of Physical Chemistry, 1988. **92**(2): p. 453-464.
162. Hussain, I., Z. Wang, A.I. Cooper, and M. Brust, *Formation of Spherical Nanostructures by the Controlled Aggregation of Gold Colloids*. Langmuir, 2006. **22**: p. 2938-2941.
163. Guerrini, L., I. Izquierdo-Lorenzo, R. Rodriguez-Oliveros, J.A. Sanchez-Gil, S. Sanchez-Cortes, J.V. Garcia-Ramos, and C. Domingo, *alpha,omega-aliphatic diamines as molecular linkers for engineering Ag nanoparticle clusters: tuning of the interparticle distance and sensing application*. Plasmonics, 2009. **5**: p. 273-286.
164. Bryant, M.A. and J.E. Pemberton, *Surface-enhanced Raman scattering of self-assembled monolayers formed from 1-alkanethiols: behaviour of films at Au and comparison to films at Ag*. Journal of the American Chemical Society, 1991. **113**(22): p. 8284-8293.
165. Bryant, M.A. and J.E. Pemberton, *Surface Raman scattering of self-assembled monolayers formed from 1-alkanethiols on Ag*. Journal of the American Chemical Society, 1991. **113**(10): p. 3629-3637.
166. Anderson, D.J. and M. Moskovits, *A SERS-active system based on silver nanoparticles tethered to a deposited silver film*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**: p. 13722-13727.
167. Sandhyarani, N. and T. Pradeep, *Characteristics of alkanethiol self assembled monolayers prepared on sputtered gold films: a surface enhanced Raman spectroscopic investigation*. Vacuum, 1998. **49**(4): p. 279-284.

168. Castro, J.L., J.C. Otero, and J.I. Marcos, *Anomalous SERS of Monocarboxylic Acids on Silver Sols*. Journal of Raman Spectroscopy, 1997. **28**: p. 765-769.
169. Tu, A.T., J. Lee, and F.P. Milanovich, *Laser-Raman spectroscopic study of cyclohexaamylose and related compounds: spectral analysis and structural implications*. Carbohydrate Research, 1979. **76**: p. 239-244.
170. Crespo-Biel, O., B. Dordi, D.N. Reinhoudt, and J. Huskens, *Supramolecular layer-by-layer assembly: alternating adsorptions of guest- and host-functionalized molecules and particles using multivalent supramolecular interactions*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**: p. 7594-7600.
171. Ruperez, A. and J.J. Laserna, *Surface-enhanced Raman spectrometry of chiral β -blocker drugs on colloidal silver*. Analytica Chimica Acta, 1996. **87**.
172. Bouchoux, G., D. Defaye, T. McMahon, A. Likholyot, O. Mo, and M. Yanez, *Structural and Energetic Aspects of the Protonation of Phenol, Catechol, Resorcinol, and Hydroquinone*. Chemistry: A European Journal, 2002. **8**(13): p. 2900-2909.
173. Socrates, G., *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. 3rd ed. 1994, New York: John Wiley & Sons, Ltd.
174. Szyzewski, A., K. Holderna-Natkaniec, and I. Natkaniec, *Progesterone and testosterone studies by neutron scattering and nuclear magnetic resonance methods and quantum chemistry calculations*. Journal of Molecular Structure, 2004. **693**(1-3): p. 49-71.
175. Hrenar, T., G. Rauhut, and H.J. Werner, *Impact of local and density fitting approximations on harmonic vibrational frequencies*. Journal of Physical Chemistry A, 2006. **110**(5): p. 2060-2064.
176. Fraile-Dotes, M.V., C. Sigüenza, and P.F. González-Díaz, *Vibrational study of solid 3,4- and 2,6-dichloroanilines* Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy, 1986. **1029-1034**.
177. Nie, S. and S.R. Emory, *Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering* Science, 1997. **275**(5303): p. 1102-1106.
178. Rycenga, M., K.K. Hou, C.M. Cobley, A.G. Schwartz, P.H.C. Camargo, and Y.N. Xia, *Probing the surface-enhanced Raman scattering properties of Au-Ag nanocages at two different excitation wavelengths*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. **11**(28): p. 5903-5908.
179. Akyuz, S. and J.E.D. Davies, *Solid-State Vibrational Spectroscopy .11. an Infrared and Raman Vibrational Spectroscopic Study of Metal(Ii) Halide Aniline Complexes*. Journal of Molecular Structure, 1982. **95**(NOV): p. 157-168.
180. Castellavventura, M. and E. Kassab, *Comparative Semiempirical and Ab-Initio Study of the Harmonic Vibrational Frequencies of Aniline .1. the Ground-State*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1994. **50**(1): p. 69-86.
181. Morzyk, B., D. Michalska, and J. Baran, *Fourier-transform Raman and infrared spectra and vibrational assignment for solid glutarimide*. Journal of Coordination Chemistry, 1999. **47**(2): p. 231-239.
182. Morzyk-Ociepa, B. and D. Michalska, *FT-Raman and infrared spectra of silver(I) complexes with glutarimidate and 3,3-dimethylglutarimidate anions*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1999. **55**(13): p. 2671-2676.

183. Fuhrer, H., R.N. Jones, H.H. Mantsch, V.B. Kartha, and P.J. Krueger, *Normal Modes and Group Frequencies - Conflict or Compromise - in-Depth Vibrational Analysis of Cyclohexanone*. Chemical Reviews, 1972. **72**(5): p. 439-&.
184. Kabo, G.J., A.A. Kozyro, V.S. Krouk, V.M. Sevruk, I.A. Yursha, V.V. Simirsky, and V.I. Gogolinsky, *Thermodynamic Properties of 6-Aminohexanoic Lactam (Epsilon-Caprolactam)*. Journal of Chemical Thermodynamics, 1992. **24**(1): p. 1-13.
185. Deluca, P.P., L. Lachman, and Schroede.Hg, *Physical-Chemical Properties of Substituted Amides in Aqueous-Solution and Evaluation of Their Potential Use as Solubilizing Agents*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1973. **62**(8): p. 1320-1327.
186. Rivas, L., A. Murza, S. Sanchez-Cortes, and J.V. Garcia-Ramos, *Adsorption of acridine drugs on silver: surface-enhanced resonance Raman evidence of the existence of different adsorption sites*. Vibrational Spectroscopy, 2001. **25**(1): p. 19-28.
187. Marichev, V.A., *First experimental evaluation of partial charge transfer during anion adsorption*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2009. **348**(1-3): p. 28-34.
188. Sibbald, M.S., G. Chumanov, and T.M. Cotton, *Reduction of cytochrome c by halide-modified, laser-ablated silver colloids*. Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(11): p. 4672-4678.
189. Rupp, C., H. Steckel, and B.W. Mueller, *Solubilization of poorly water-soluble drugs by mixed micelles based on hydrogenated phosphatidylcholine*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **395**(1-2): p. 272-280.
190. Ma, B., Y. Shen, Z. Fan, Y. Zheng, H. Sun, J. Luo, and M. Wang, *Characterization of the inclusion complex of 16,17 alpha-epoxyprogesterone with randomly methylated beta-cyclodextrin in aqueous solution and in the solid state*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2011. **69**(1-2): p. 273-280.
191. Fini, A., F. Ospitali, G. Zoppetti, and N. Puppini, *ATR/Raman and Fractal Characterization of HPBCD/Progesterone Complex Solid Particles*. Pharmaceutical Research, 2008. **25**(9): p. 2030-2040.
192. Koch, R.B., *Inhibition of animal tissue ATPase activities by chlorinated hydrocarbon pesticides*. Chem Biol Interact, 1969. **1**(2): p. 199-209.
193. Folmar, L.C., *Invitro Inhibition of Rat-Brain Atpase, Pnppase, and Atp-P-32(I) Exchange by Chlorinated-Diphenyl Ethanes and Cyclodiene Insecticides*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1978. **19**(4): p. 481-488.
194. Luo, M. and R.P. Bodnaryk, *The Effect of Insecticides on (Ca-2++Mg-2+)-Atpase and the Atp-Dependent Calcium-Pump in Moth Brain Synaptosomes and Synaptosome Membrane-Vesicles from the Bertha Armyworm, Mamestra-Configurata Wlk*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1988. **30**(2): p. 155-165.
195. Videira, R.A., M.C. Antunes-Madeira, and V.M.C. Madeira, *Differential effects induced by alpha- and beta-endosulfan in lipid bilayer organization are reflected in proton permeability*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2002. **1564**(1): p. 140-148.
196. Lee, A.G., *Lipids and Their Effects on Membrane-Proteins - Evidence against a Role for Fluidity*. Progress in Lipid Research, 1991. **30**(4): p. 323-348.

197. G.T. Brooks, A.o.c.i., in: G. Zweig (Ed.), Chlorinated Insecticides, CRC Press, Cleveland, OH, 1974, pp. 63–144, *Action of chlorinated insecticides*. In: *Chlorinated Insecticides*, ed. G. Zweig. 1974: CRC Press, Cleveland, OH. 63–144.
198. Ecobichon, D.J., *Toxic effects of pesticides*. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 5th ed, ed. M.O.A. C. D. Klaassen, J. Doull, and L. J. Casarett. 1996: McGraw-Hill, New York. 643–689.
199. Naqvi, S.M. and C. Vaishnavi, *Bioaccumulative Potential and Toxicity of Endosulfan Insecticide to Nontarget Animals*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 1993. **105**(3): p. 347-361.
200. Saxena, P.N. and V.D. Gupta, *Role of molecular geometry, valence charge distribution and vibrational modes in bioactivity of cyclodiene insecticides*. *Journal of Applied Toxicology*, 2005. **25**: p. 29-46.
201. Zhang, L., P. Somasundaran, J. Mielczarski, and E. Mielczarski, *Adsorption Mechanism of n-dodecyl- β -D-maltoside on Alumina*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002. **256**: p. 16-22.
202. Zhang, L., P. Somasundaran, and C. Maltesh, *Adsorption of n-Dodecyl- β -D-maltoside on Solids*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1997. **191**: p. 202-208.
203. Harris, D.C., *Análisis químico cuantitativo*. 3rd ed, ed. Reverté. 2007.
204. Li, S.T., J.S. Wang, and S.L. Zhao, *Determination of terbutaline sulfate by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2009. **877**(3): p. 155-158.
205. Zheng, L.H., P. Tong, X.Y. Zheng, Y.W. Chi, G.N. Chen, and L. Zhang, *Ellectrostacking online sample pre-concentration capillary electrophoresis with amperometric detection for beta(2)-agonists in human urine*. *Journal of Separation Science*, 2008. **31**(20): p. 3556-3564.
206. Brunelli, C., C. Bicchi, A. Di Stilo, A. Salomone, and M. Vincenti, *High-speed gas chromatography in doping control: Fast-GC and fast-GC/MS determination of -adrenoceptor ligands and diuretics* *Journal of Separation Science*, 2006. **29**(18): p. 2765-2771.
207. Abdelkhalik, M.M., M.S. Mahrous, H.G. Daabees, and Y.A. Beltagy, *Spectrophotometric determination of aminoglutethimide by diazotization and subsequent coupling*. *Analytical Letters*, 1993. **26**(6): p. 1109-1123.
208. Kang, M.J., Y.H. Hwang, W. Lee, and D.H. Kim, *Validation and application of a screening method for beta 2-agonists, anti-estrogenic substances and mesocarb in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007. **21**(2): p. 252-264.
209. Poon, G.K., G.M.F. Bisset, and P. Mistry, *Electrospray-ionization mass-spectrometry for analysis of low-molecular-weight anticancer drugs and their analogs*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1993. **4**(7): p. 588-595.
210. Aboul-Enein, H.Y., S. Ozkirimli, and T.I. Apak, *Determination of aminoglutethimide enantiomers as dansyl derivative in human plasma by HPLC with fluorescence detection*. *Archiv Der Pharmazie*, 1999. **332**(4): p. 145-147.
211. Cesur, N., T.I. Apak, H.Y. Aboul-Enein, and S. Ozkirimli, *LC determination of amino glutethimide enantiomers as dansyl and fluorescamine derivatives in*

- tablet formulations*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002. **28**(3-4): p. 487-492.
212. Deventer, K., F.T. Delbeke, K. Roels, and P. Van Eenoo, *Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Biomedical Chromatography, 2002. **16**(8): p. 529-535.
213. Ventura, R., M. Roig, N. Monfort, P. Saez, R. Berges, and J. Segura, *High-throughput and sensitive screening by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of diuretics and other doping agents*. European Journal of Mass Spectrometry, 2008. **14**(3): p. 191-200.
214. Sun, L., Y. Liu, X.G. Chu, and J.M. Lin, *Trace Analysis of Fifteen Androgens in Environmental Waters by LC-ESI-MS-MS Combined with Solid-Phase Disk Extraction Cleanup*. Chromatographia, 2010. **71**(9-10): p. 867-873.
215. Saito, K., K. Yagi, A. Ishizaki, and H. Kataoka, *Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **52**(5): p. 727-733.
216. Deshmukh, N., I. Hussain, J. Barker, A. Petroczi, and D.P. Naughton, *Analysis of anabolic steroids in human hair using LC-MS/MS*. Steroids. **75**(10): p. 710-714.
217. Gasparini, M., M. Curatolo, W. Assini, E. Bozzoni, N. Tognoli, and G. Dusi, *Confirmatory method for the determination of nandrolone and trenbolone in urine samples using immunoaffinity cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(46): p. 8059-8066.
218. Shen, M., H. Yan, P. Xiang, and B.H. Shen, *Simultaneous Determination of Anabolic Androgenic Steroids and Their Esters in Hair by LC-MS-MS*. Chromatographia, 2009. **70**(9-10): p. 1381-1386.
219. Goulet, P.J.G. and R.F. Aroca, *Distinguishing Individual Vibrational Fingerprints: □ Single-Molecule Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering from One-to-One Binary Mixtures in Langmuir–Blodgett Monolayers*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(9): p. 2728-2734.
220. Le Ru, E.C., J. Grand, I. Sow, W.R.C. Somerville, P.G. Etchegoin, M. Treguer-Delapierre, G. Charron, N. Felidj, G. Levi, and J. Aubard, *A Scheme for Detecting Every Single Target Molecule with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Nano Letters, 2011. **11**: p. 5013-5019.
221. Haynes, C.L., A.D. McFarland, and R.P. Van Duyne, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(17): p. 338A-346A.
222. Graham, D. and R. Goodacre, *Chemical and bioanalytical applications of surface enhanced Raman scattering spectroscopy*. Chemical Society Reviews, 2008. **37**: p. 883-884.

9. ANEXOS

9.1. Respuesta óptica del coloide de AgHX agregado con α,ω - bifuncionales alifáticos.....	172
9.2. Tablas de asignaciones de espectros de vibración.....	174
9.3. Espectro SERS de clenbuterol en coloide de Ag.....	179

Anexo 1. Respuesta óptica del coloide de AgHX agregado con α,ω -bifuncionales alifáticos

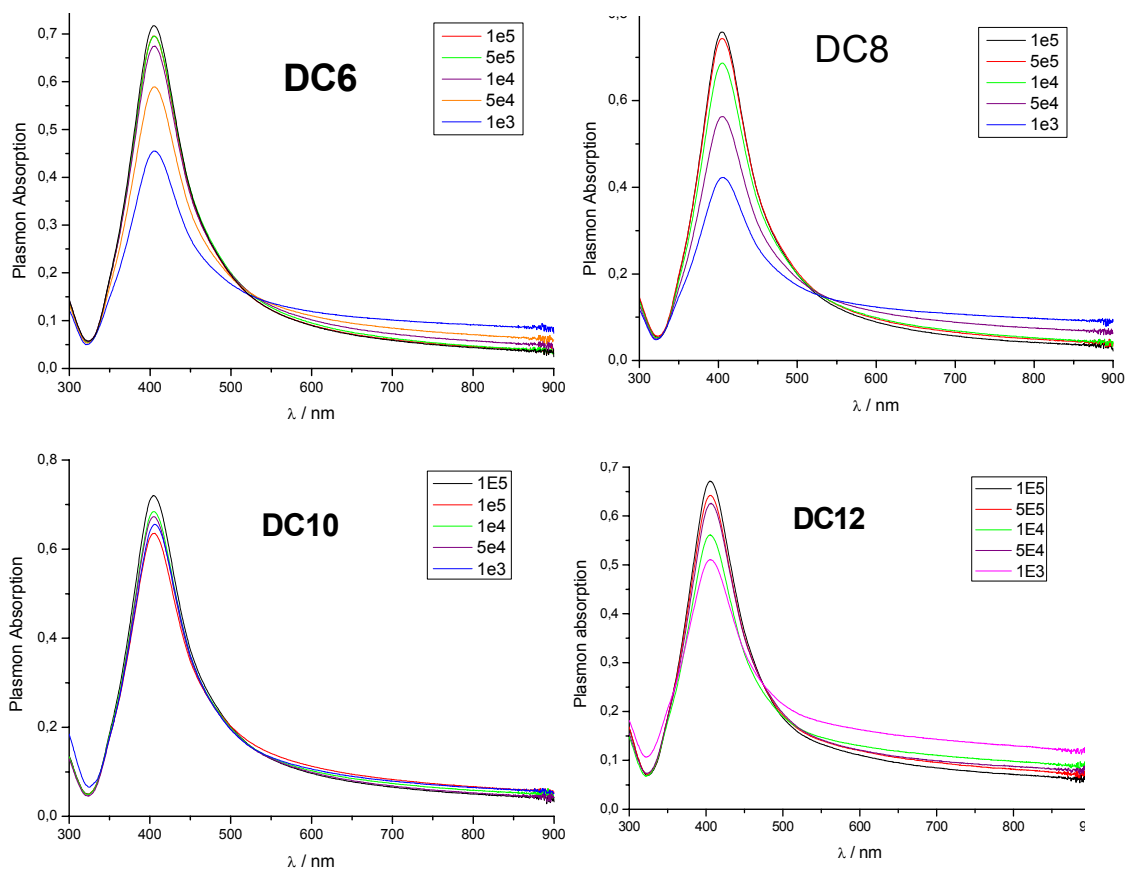


Figura 9.1. Espectros UV-visible del coloide de AgHX agregado con dicarboxilatos

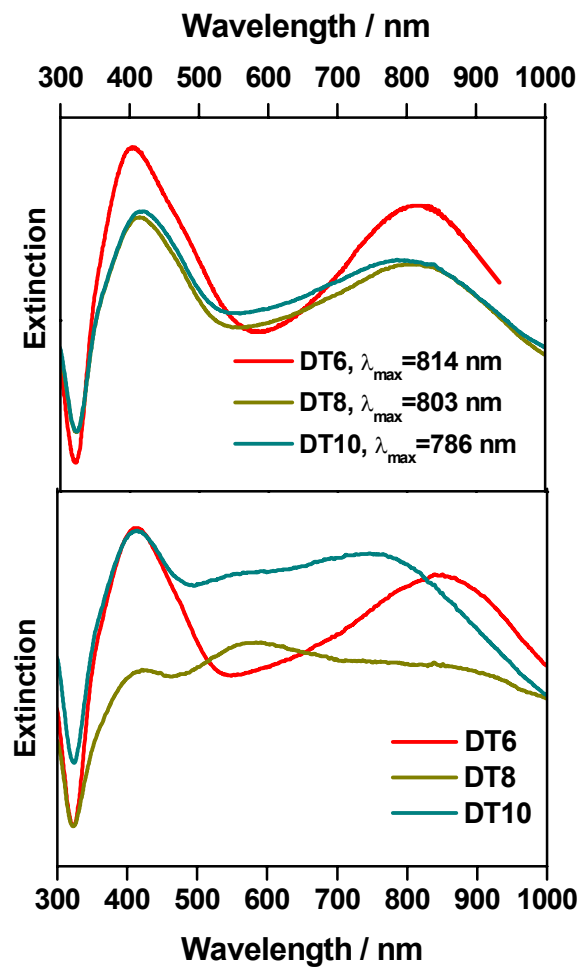


Figura 9.2. Espectros de extinción UV-visible del coloide de AgHX agregado con DT6, DT8 y DT10 a 5×10^{-6} M (agregados lineales) y 5×10^{-4} M (agregados globulares)

Anexo 2. Tablas de asignaciones de espectros de vibración**Tabla 9.1.** Asignación de bandas de las vibraciones más importantes presentes en los espectros IR y Raman del clembuterol.

RAMAN	IR	Frecuencia calculada	Asignación
	3351	3579	$\nu_{as}(\text{NH}_2)$
		3486	$\nu(\text{OH})$
3244	3248	3479	$\nu_s(\text{NH}_2)$
3204		3387	$\nu(\text{NH})$
3065		3126	$\nu_{ar}(\text{CH})$
3032		3088	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
2979	2974	3020	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
2922		3004	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2800		2944	$\nu_s(\text{CH}_3)$
	1622	1643	$\delta(\text{NH}_2)$
1597		1590	$\nu(\text{C}=\text{C})/\delta(\text{NH}_2)$
	1581	1541	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1482	1485	1471	$\nu_{ar}/\nu_{ar}(\text{C-N})$
1445	1454	1416	$\delta(\text{CH}_3)/\delta(\text{CH}_2)/\delta(\text{CH})$
	1425		$\delta(\text{CH}_3)$
1365	1377	1344	$\omega(\text{CH}_2)/\delta_{al}(\text{CH})$
	1327	1323	$t(\text{CH}_2)/\delta(\text{OH})/\delta(\text{CH})$
1287	1283	1297	$\nu_{ar}/\nu_{ar}(\text{C-N})$
1237	1241	1237	$\nu(\text{CC}_3)/t(\text{CH}_2)/\delta(\text{OH})$
1211	1210	1203	$t(\text{CH}_2)/\delta(\text{OH})/\delta(\text{CH})/\nu_{al}(\text{C-N})$
	1104	1083	$\nu(\text{C-O})/\nu_{al}(\text{C-N})$
1080	1080	1061	$\rho(\text{NH}_2)/\nu_{al}(\text{C-N})$
1053	1053	1036	$\rho(\text{CH}_3)$
1003	1003	992	$\rho(\text{CH}_3)/\nu(\text{CC})$
924	922	899	$\gamma_{ar}(\text{CH})$
874	885	849	$\gamma_{ar}(\text{CH})/\rho(\text{CH}_3)$
851	849		$\gamma_{ar}(\text{CH})$
	784	753	$\nu_{as}(\text{C-Cl})/\nu_{ar}$
747		744	$\nu(\text{C-Cl})$
	648	603	τ_{al}
378		357	$\delta_{ip}(\text{C-C-Cl})$

Tabla 9.2. Asignación de bandas de las vibraciones más importantes presentes en los espectros IR y Raman del salbutamol.

RAMAN	IR	Frecuencia calculada	Asignación
	3316	3434	$\nu(\text{NH})$
	3186	3420	$\nu(\text{OH})$
3055		3118	$\nu_{\text{ar}}(\text{CH})$
2980		3041	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)/\nu(\text{CH})$
	2967	3041	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
2977		2930	$\nu_{\text{s}}(\text{CH})$
2883		2940	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
	2879	2929	$\nu(\text{CH})$
1611	1610	1626	$\nu_{\text{ar}}(\text{C}=\text{C})$
	1506	1530	$\delta(\text{NH})$
	1486	1517	$\delta(\text{CH}_3)$
1466	1456	1498	$\delta(\text{CH}_2)/\delta(\text{CH}_3)/\delta(\text{CH})$
	1394	1445	$\delta(\text{CH}_3) \nu_{\text{ar}}$
	1366	1380	$\omega(\text{CH}_2)/\delta_{\text{al}}(\text{CH})$
1354	1343	1358	$\delta(\text{CH})/\tau(\text{CH}_2)/\delta(\text{OH})$
1271	1270	1303	$\tau(\text{CH}_2)/\delta_{\text{al}}(\text{CH})$
1236	1235	1260	$\nu(\text{CC}_3)/\nu_{\text{ar}}(\text{CO})/\delta_{\text{al}}(\text{CH})$
	1219	1236	$\nu(\text{CC}_3)/\nu_{\text{al}}(\text{CN})/\delta(\text{OH})$
	1189	1189	$\tau(\text{CH}_2)/\delta(\text{CH})$
1106	1106	1150	$\delta_{\text{ar}}(\text{CH})/\delta(\text{OH})$
1082	1081	1102	$\nu(\text{CO})/\delta_{\text{ar}}(\text{CH})/\nu_{\text{ar}}$
	1040	1051	$\rho(\text{CH}_3)/\nu(\text{CC}_3)$
1023	1025	1042	$\rho(\text{CH}_3)/\nu(\text{CC}_3)$
	966	999	$\nu_{\text{al}}(\text{CO})$
962	953	969	$\gamma_{\text{ar}}(\text{CH})/\rho(\text{CH}_2)$
922	902	928	$\rho(\text{CH}_2)/\rho(\text{CH}_3)$
883		906	$\nu_{\text{al}}(\text{CC})$
	852	875	$\nu_{\text{al}}(\text{CC})$
814	822	818	$\gamma_{\text{ar}}(\text{CH})$
775		779	$\gamma_{\text{ar}}(\text{CH})$
723	722	755	τ_{al}
613	615	617	τ_{al}

Tabla 9.3. Asignación de las bandas más importantes de los espectros Raman e IR de la aminoglutetimida en estado sólido.

RAMAN (sólido)	RAMAN (EtOH)	FTIR	DFT	Asignación propuesta
3462		3475	3738	$\nu_{as}(\text{NH}_2)$
3379		3377	3610	$\nu_s(\text{NH}_2)$
3200		3202	3552	$\nu(\text{NH})$
		3099	3198	$\nu_{ar}(\text{CH})$
3059			3144	$\nu_{ar}(\text{CH})$
3017			3134	$\nu_{ar}(\text{CH})$
2970		2968	3073	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
2947		2946	3025	$\nu_s(\text{CH}_2)$ GI
2914		2915	2995	$\nu_s(\text{CH}_2)$ Et
2881		2879	3015	$\nu_s(\text{CH}_3)$
1707	1714	1712	1684	$\nu(\text{C=O})$
1682		1696	1680	$\nu_{as}(\text{C=O})$
1620	1611	1620	1627	$\nu(\text{C=C})$
1516	1513	1517	1428	$\delta(\text{NH})$ GI
1458	1455	1456	1495	$\delta_{ss}(\text{CH}_2)$
1439	1433	1439	1491	$\delta_{ss}(\text{CH}_2)$
1414	1410	1414	1403	$\delta(\text{CH}_2)$
		1370	1459	$\delta(\text{CH}_3)$ sym
		1350	1343	$\nu_{ar}(\text{C-NH}_2)$
1294	1292	1296	1314	$\omega(\text{CH}_2) / \nu(\text{C-NH}_2)$
		1270		$t(\text{CH}_2)$
1225			1238	$\delta_{ip}(\text{CH}) / \nu_{ar}(\text{C-NH}_2)$
1201		1204	1203	$\delta_{ip}(\text{CH})$
1190	1188	1190	1300	$\delta(\text{CH}) / \nu(\text{C-NH})$
1153	1147		1174	$\delta_{ip}(\text{CH}) / t(\text{CH}_2)$
1078	1075		1100	$\delta_{ip}(\text{CH}) / \rho(\text{NH}_2)$
1049		1047	1040	$\nu_{al}(\text{CC}) / \rho(\text{CH}_3)$
		854	851	} $\delta(\text{CCN}) / \rho(\text{CH}_2)$
835	834	823	834	
801		801	817	
654			670	$\delta(\text{CNC})$
642	640	644		$\delta_{ar}(\text{CNC})$
579			540	$\delta_{op}(\text{CCC})$
526			535	$\delta(\text{C=O})$

Tabla 9.4. Asignación de las bandas SERS de la aminoglutetimida en AuCT (pH=4.0), AgCT (pH=9.0) a dos niveles de concentración, y AgNPT (pH = 9)

SERS AuCT	SERS AgCT 10 ⁻⁷ M	SERS AgCT 3*10 ⁻⁵ M	SERS AgNPT 3*10 ⁻⁵ M	Asignación propuesta	Grupo de AGI
		3064m	3065w	$\nu_{ar}(\text{CH})$	AN
	2936m	3013w 2936s 2876m	2933s 2880m	$\nu_s(\text{CH}_2)$ $\nu_s(\text{CH}_3)$	GI GI
1607vs	1607vs	1702 w		$\nu(\text{C=O})$	GI
1509w	1516w	1606vs	1607vs	$\nu(\text{C=C})$	AN
			1510w	$\delta(\text{NH})$	GI
		1491m		$\nu(\text{C=N})/\nu(\text{C=O})$	Ag-GI
		1454s	1450w	$\delta(\text{CH}_2)$	GI
				$\delta(\text{CH}_2)$	GI
1380m	1381m	1405w		$\delta(\text{CH}_2)$	GI
				$\delta(\text{CH}_3)$	GI
		1335sh	1330s	$\nu(\text{C=N})$	Ag-GI
1294w	1305w	1306vs		$\nu(\text{C=N})$	Ag-GI
	1253w			$\omega(\text{CH}_2)/\nu(\text{C-NH}_2)$	AN/GI
1233m				$t(\text{CH}_2)$	GI
				$\delta_{ip}(\text{CH})/\nu_{ar}(\text{C-NH}_2)$	AN
		1219w	1213vw	$t(\text{CH})$	GI
				$\delta_{ip}(\text{CH})$	AN
1189m	1192m	1190m	1190m	$\delta(\text{CH})/\nu(\text{C-NH})$	AN
	1150w			$\delta_{ip}(\text{CH}) / t(\text{CH}_2)$	AN/GI
		1150vs	1147m	$\nu(\text{C-O}) / t(\text{CH}_2)$	Ag-GI
1076vs	1062w	1078m	1080m	$\rho(\text{NH}_2) / \delta_{ip}(\text{CH})$	AN
1012 m				$\nu(\text{CC})/\rho(\text{CH}_3)$	GI
		947s	950w	$\delta(\text{CNC})/\rho(\text{CH}_3)$	Ag-GI
888m			893w		
833m	835m	837m	833 m	$\delta(\text{CCN})/\rho(\text{CH}_2)$	GI
798w					
		746w	732vw	$\rho(\text{CH}_2)$	GI
	664m	663w	666w	$\delta(\text{CNC})$	GI
647vs				$\delta_{ar}(\text{CCN})/ \delta_{ar}(\text{CNH})$	AN
		643w	642w	$\delta_{ar}(\text{CNC})$	AN
	622w	633m		$\delta(\text{N-C=O})$	GI
587m	598w	596w	596vw	$\delta_{op}(\text{CCC})$	AN

Tabla 9.5. Asignación de las bandas más importantes de los espectros IR y Raman del probenecid en estado sólido.

IR	Raman	DFT	Asignación propuesta
3250-2500		3591*	$\nu(\text{OH})$
3094	3080	3092	$\nu_{\text{ar}} \text{CH}$
3053		3010	$\nu_{\text{ar}} \text{CH}$
2966	2966	2974	$\nu(\text{CH}_3)$
2931	2932	2934	$\nu(\text{CH}_3)$
2874	2872	2885	$\nu(\text{CH}_2)$
1690			$\nu \text{C}=\text{O}$
	1638		$\nu_{\text{ar}}(\text{C}=\text{C})$
1602	1599	1579	$\nu_{\text{ar}}(\text{C}=\text{C})$
1469	1445	1448	$\delta_{\text{ss}}\text{CH}_2$
1426		1378	$\delta_{\text{ss}}\text{CH}_2$
1346	1346	1330	$\delta(\text{OH})$
1309		1308	$\omega(\text{CH}_2)$
1289			$\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$
	1279	1281	$t(\text{CH}_2)$
1180	1179	1173	$t(\text{CH}_2)$
1158	1158	1152	$\delta_{\text{ip}}(\text{CH}), \delta_{\text{ip}}(\text{OH})$
1126	1128		$\nu_{\text{s}}(\text{SO}_2)$
1084	1084	1081	$\delta_{\text{ar}}(\text{CC}), \nu(\text{CS})$
1040	1040	1035	$\delta_{\text{ar}}(\text{CC}), \nu(\text{C-OH})$
997	997	998	$\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$
928		926	$\nu(\text{N-S})$
866	864	865	ω
	818	818	ω
797	806		$\rho(\text{C}_1)$
777	778	770	$\delta_{\text{ar}}(\text{CC})$
739	741	749	Combinación
712	698		$\delta_{\text{op}} \text{C-OH}$ ó $\nu_{\text{as}}(\text{CSN})$
688		673	$\delta_{\text{op}}(\text{Ph})$
	629	639	$\delta(\text{CO}_2)$
		619	$\delta(\text{Ph})$
606	608	595	$\delta_{\text{op}}(\text{OH})$
564	562	569	Vibración de esqueleto
541		540	$\delta_{\text{op}}(\text{CH}), \delta\text{OH}$
	480	474	$\delta_{\text{op}}(\text{CC})$
460	403	425	$\delta_{\text{ip}}(\text{CC})$

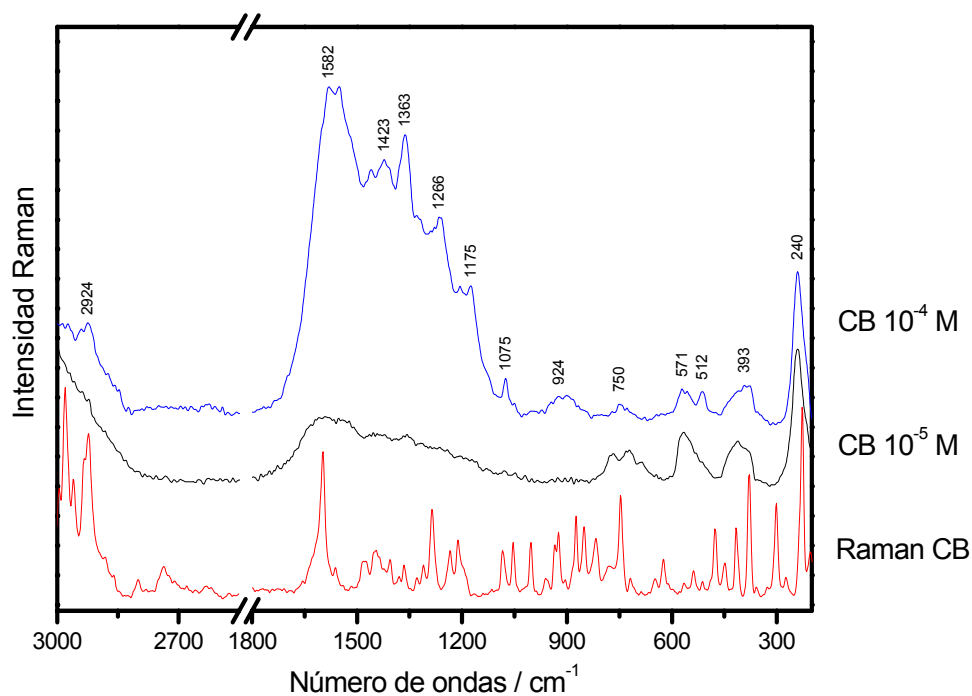
Anexo 3. Espectro SERS de clenbuterol en coloide de Ag

Figura 9.3. Espectro SERS de CB (10^{-4} y 10^{-5} M) en coloide de AgHX, $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm. Espectro Raman de CB sólido, $\lambda_{\text{exc}} = 1064$ nm.