

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Processi Industriali

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria dei Materiali

Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica “Giulio Natta”



**SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI SUBSTRATI SERS
(SURFACE ENHANCED RAMAN SCATTERING)
PER APPLICAZIONI ANALITICHE**

Relatore: Prof. Matteo Tommasini

Correlatore: Dott. Andrea Lucotti

Tesi di Laurea di:
Alberto Morganti
matricola 734739

Anno Accademico 2009-2010

Ringraziamenti

Al termine di questo lavoro di tesi desidero ringraziare il Prof. Matteo Tommasini e il Dott. Andrea Lucotti per la disponibilità e la competenza che hanno saputo dedicarmi nel corso di quest'anno. Oltre ad avermi insegnato tante cose sono riusciti anche a trasmettermi quella passione con la quale svolgono il proprio lavoro ogni giorno, necessaria affinché il compito che si è chiamati a svolgere non diventi un peso ma sia invece motivo di grandi soddisfazioni.

Un grazie anche al Dott. Michele Casella per i suggerimenti e i consigli che ha saputo fornirmi e che sono risultati molto preziosi soprattutto nell'ultima parte di questo lavoro.

Indice analitico

Introduzione	» 1
Capitolo I Spettroscopia Raman	» 4
1.1 Raman Scattering	» 4
1.2 Descrizione classica dell'effetto Raman	» 5
1.3 Descrizione quantistica dell'effetto Raman	» 9
1.4 Raman Risonante	» 13
Capitolo II SERS (Surface Enhanced Raman Scattering)	» 15
2.1 Introduzione	» 15
2.2 Substrati SERS	» 17
2.3 Il modello di Drude e la risposta ottica dei metalli	» 18
2.4 Plasmoni	» 20
2.5 Enhancement elettromagnetico	» 23
2.6 Enhancement chimico	» 28
2.7 Enhancement globale	» 29
2.8 Calcolo dell'enhancement	» 31
2.9 Single molecule spectroscopy	» 32
Capitolo III Strumentazione utilizzata	» 35
3.1 Raman dispersivo LabRAM HR800	» 35
3.2 FT-Raman Nicolet NXR 9650	» 40
3.3 Spettrofotometro UV-VIS JASCO V-570	» 42

Capitolo IV Colloidi	» 45
4.1 Lo stato colloidale	» 45
4.2 Nanoparticelle metalliche	» 47
4.2.1 Introduzione	» 47
4.2.2 Il doppio strato elettrico	» 48
4.2.3 La parte interna del doppio strato (Stern layer)	» 49
4.2.4 La parte esterna del doppio strato (strato diffusivo)	» 50
4.2.5 Stabilità dei colloidi	» 51
4.3 Sintesi di nanoparticelle in soluzione acquosa	» 54
4.3.1 Introduzione	» 54
4.3.2 Sintesi di nanoparticelle di argento con trisodio citrato	» 55
4.3.3 Misura del coefficiente di estinzione molare	» 61
4.3.4 Sintesi di nanoparticelle di argento con boridruro di sodio	» 64
4.3.5 Sintesi di nanoparticelle di oro con trisodio citrato	» 66
4.3.6 Misura del coefficiente di estinzione molare	» 69
4.3.7 Sintesi di nanoparticelle di oro concentrate con trisodio citrato	» 71
4.3.8 Sintesi di nanoparticelle di argento concentrate con trisodio citrato e seed solution	» 73
4.4 Centrifugazione dei colloidi	» 74
4.4.1 Introduzione	» 74
4.4.2 Modello di centrifugazione per colloidi di argento	» 77
4.4.3 Centrifugazione dei colloidi di argento	» 80
4.5 Immobilizzazione di nanoparticelle su substrati vetrosi	» 89
Capitolo V Detezione SERS dell'apomorfina	» 96
5.1 Introduzione	» 96
5.2 Apomorfina	» 97
5.3 Malachite-green e 2-naftalentiolo	» 103
5.4 Detezione dell'apomorfina tramite colloidi concentrati o aggregati	» 105
5.5 Riproducibilità e cinetica del segnale SERS in sospensione acquosa	» 109
5.6 Rilevazione di analiti su substrati solidi	» 115
5.6.1 Detezione del 2-naftalentiolo	» 116
5.6.2 Rilevazione dell'apomorfina	» 119

Capitolo VI Applicazione del SERS alla detezione dell'apomorfina	» 127
6.1 Introduzione	» 127
6.2 TLC (Thin Layer Chromatography)	» 128
6.3 Albumina	» 130
6.4 Detezione dell'apomorfina in soluzione di albumina o plasma con TLC	» 131
Conclusioni	» 136
Bibliografia	» 139

Indice delle figure

Capitolo I

1. Rayleigh scattering e Raman scattering » 4
2. Schematizzazione di una molecola biatomica eteronucleare » 5
3. Potenziale per una molecola biatomica in funzione della distanza R » 5
4. Potenziale armonico descritto in funzione dello scostamento r dall'equilibrio » 6
5. Oscillatore armonico quantizzato » 10
6. Schematizzazione dei processi di scattering Rayleigh, Stokes e anti-Stokes » 10
7. Intensità relative e frequenze di una radiazione diffusa da una molecola » 11
8. Potenziale di interazione anarmonico » 12
9. Raman Risonante, Raman non risonante e fluorescenza » 13

Capitolo II

1. Spettri Raman e SERS del Cristal Violet » 16
2. Parti reali e complesse delle costanti dielettriche di oro e argento » 20
3. Spostamento della nube elettronica tramite interazione con E » 20
4. Picchi di risonanza plasmonica per varie geometrie di nanoparticelle » 21
5. Picchi di scattering in funzione delle dimensioni delle nanoparticelle » 22
6. Estinzione, scattering e assorbimento per particelle da 20 e 100 nm » 22
7. Proprietà ottiche delle nanoparticelle in funzione del loro raggio » 23
8. Enhancement elettromagnetico » 24
9. Modello quasi statico per una particella immersa in un campo elettrico » 24
10. Fattore di intensificazione della radiazione SERS » 26
11. Dipoli, quadripoli e multipoli » 27
12. Effetti ottici e di innalzamento del fattore di intensificazione SERS » 28
13. Enhancement chimico » 29
14. Analita e sezione d'urto per il Raman » 30

15. Analita e sezione d'urto per il SERS	» 30
16. Intensità Raman registrate per la banda a 1174 cm ⁻¹ del CV	» 33
17. Occorrenze in funzione dell'intensità per la banda a 1174 cm ⁻¹ del CV	» 33
18. Moto browniano e volume di scattering	» 34
19. Intensità Raman registrate per una banda del metanolo	» 34

Capitolo III

1. Raman dispersivo LabRAM HR800	» 35
2. Elementi principali dello spettrometro dispersivo LabRAM HR800	» 36
3. Monocromatore Czerny-Turner asimmetrico	» 38
4. FT-Raman Nicolet NXR 9650	» 40
5. Vista dall'alto dello spettrometro FT-Raman Nicolet NXR 9650	» 40
6. Spettrometro UV-VIS della JASCO V-570	» 42
7. Schema di funzionamento dello spettrometro JASCO V-570	» 42
8. Cuvetta in quarzo utilizzata per le misure di assorbanza	» 43
9. Intensità entrante e uscente dalla cuvetta e legge di Lambert-Beer	» 43

Capitolo IV

1. Scattering della luce da parte dei colloidali	» 46
2. Utilizzo delle nanoparticelle in ambito artistico	» 47
3. Rappresentazione di una nanoparticella metallica in soluzione	» 49
4. Potenziale in funzione della distanza dalla nanoparticella metallica	» 50
5. Potenziale di interazione fra due particelle in soluzione	» 51
6. Potenziali repulsivi e attrattivi	» 52
7. Curve di potenziale calcolate per vari valori del potenziale di Stern	» 53
8. Curve di potenziale per vari valori del parametro κ	» 53
9. Nucleazione ed accrescimento di una nanoparticella	» 55
10. Stabilizzazione delle nanoparticelle ad opera del trisodio citrato	» 56
11. Nanoparticelle di argento ottenute tramite metodo Lee-Meisel	» 57
12. Spettri di assorbimento per colloidali di argento tramite metodo Lee-Meisel	» 58
13. Diametro delle nanoparticelle in funzione del massimo di assorbimento	» 59
14. Immagine SEM di nanoparticelle di argento	» 60
15. Proporzionalità nella legge di Lambert-Beer	» 62

16. Spettro di assorbimento della soluzione 4 diluita	» 62
17. Retta di taratura per la soluzione 6	» 64
18. Nanoparticelle di argento ottenute mediante riduzione con boroidruro	» 65
19. Spettro di assorbimento per nanoparticelle di argento stabilizzate	» 66
20. Schematizzazione del processo di nucleazione delle nanoparticelle d'oro	» 67
21. Strato interno del doppio strato elettrico per nanoparticelle di oro	» 67
22. Soluzione colloidale di nanoparticelle di oro	» 68
23. Spettro di assorbimento del colloide di oro	» 69
24. Spettro di assorbimento del colloide di oro diluito	» 70
25. Spettri di assorbimento di colloidali di oro concentrati e non concentrati	» 72
26. Confronto tra le colorazioni dei colloidali di oro	» 72
27. Spettri di assorbimento di colloidali di argento concentrati e seed-solution	» 74
28. Forze agenti su una nanoparticella in soluzione durante centrifugazione	» 75
29. Separazione tra precipitato e soprannatante dopo centrifugazione	» 76
30. Schematizzazione per il processo di centrifugazione	» 77
31. Diametri delle particelle che precipitano in funzione del parametro k	» 78
32. Sedimentazione in funzione del tempo per un diametro di nanoparticelle	» 79
33. Sedimentazione in funzione del tempo per tre diametri di nanoparticelle	» 80
34. Centrifuga da banco Hettich EBA 21	» 80
35. I rotori a swing-out e ad angolo fisso	» 81
36. Spettri di assorbimento della fase soprannatante all'aumentare del tempo	» 82
37. Spettri di assorbimento indicanti frazioni della distribuzione dei diametri	» 83
38. Grafico relativo allo spettro in azzurro della figura 37	» 84
39. Grafico relativo allo spettro in blu della figura 37	» 85
40. Grafico relativo allo spettro in verde della figura 37	» 87
41. Spettri di assorbimento di colloidali al variare del numero di iterazioni	» 88
42. Aspetto dei colloidali al variare del numero di iterazioni	» 89
43. Processo di immobilizzazione di nanoparticelle di argento con APTMS	» 92
44. Processo di immobilizzazione di nanoparticelle di argento con MPTMS	» 93
45. Vetrini funzionalizzati con APTMS	» 93
46. Spettri di assorbimento di nanoparticelle immobilizzate su vetrino	» 94

Capitolo V

1. Formula strutturale dell'apomorfina-idrocloruro	» 98
2. Spettri Raman di Apomorfina e Apofin [®]	» 99
3. Possibile posizionamento dell'apomorfina ossidata su una nanoparticella	» 100
4. Confronto tra analisi sperimentali e teoriche sul SERS dell'apomorfina	» 101
5. Spettri SERS dell'Apofin [®] registrati al variare dei substrati e del metallo	» 103
6. Formula strutturale della malachite-green	» 103
7. Spettri SERS della malachite-green registrati in soluzione acquosa	» 104
8. Formula di struttura del 2-naftalentiolo	» 104
9. Meccanismi di adsorbimento proposti per l'1-naftalentiolo e il 2-naftalentiolo	» 105
10. Spettri SERS del 2-naftalentiolo	» 105
11. Spettri SERS dell'Apofin [®] in soluzione acquosa ($4 \cdot 10^{-5}$ M)	» 106
12. Spettri SERS dell'Apofin [®] in soluzione acquosa (10^{-8} M e 10^{-9} M)	» 107
13. Spettri SERS dell'Apofin [®] in soluzione acquosa di NaCl	» 109
14. Prove di riproducibilità SERS effettuate con malachite-green 10^{-6} M	» 110
15. Intensità SERS delle bande a 1396 cm^{-1} della malachite-green 10^{-6} M	» 111
16. Spettri SERS della malachite-green registrati in funzione del tempo	» 112
17. Evoluzione temporale del SERS della malachite-green	» 113
18. Spettri SERS dell'Apofin [®] ottenuti con colloide seed concentrato 20 volte	» 114
19. Andamenti delle intensità assolute e relative per le bande a 1643 cm^{-1}	» 114
20. Mapping 1D del 2-naftalentiolo su vetrino con nanoparticelle di argento	» 117
21. Mapping 2D del 2-naftalentiolo su vetrino con nanoparticelle di argento	» 119
22. Mapping 1D dell'apomorfina 10^{-8} M su vetrino con nanoparticelle di argento	» 121
23. Mapping 1D dell'apomorfina $8 \cdot 10^{-5}$ M su vetrino con nanoparticelle di oro	» 123
24. Mapping 2D dell'apomorfina 10^{-8} M su vetrino con nanoparticelle di argento	» 124
25. Mapping 2D dell'apomorfina 10^{-4} M su vetrino con nanoparticelle di oro_1	» 125
26. Mapping 2D dell'apomorfina 10^{-4} M su vetrino con nanoparticelle di oro_2	» 126

Capitolo VI

1. Substrato poroso per TLC	» 128
2. Deposizione di sostanze su un substrato solido per TLC	» 129
3. Immersione della fase stazionaria in quella mobile per un'analisi TLC	» 129
4. Struttura dell'albumina	» 130

5. SERS dell'Apofin[®] (10^{-7} M) in soluzione acquosa di albumina su lastra TLC » 133
6. SERS dell'Apofin[®] (10^{-4} M) in plasma su lastra TLC » 135

Indice delle tabelle

Capitolo III

1. Laser disponibili sullo spettrometro Raman dispersivo LabRAM HR800 » 37
2. Densità ottica dei filtri e relative potenze effettive incidenti » 39

Capitolo IV

1. Principali categorie di sistemi colloidali » 45
2. Possibili stati fisici in soluzione in funzione del diametro delle particelle » 45
3. Lunghezze d'onda e larghezze dei picchi delle soluzioni Lee-Meisel » 58

Capitolo V

1. Posizione delle bande sperimentali e teoriche dell'apomorfina ossidata » 102

Abstract

This thesis deals with Raman Spectroscopy and SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) techniques, used for the detection of analytes at a low concentration level by means of silver and gold colloids. A synthetic description of the colloidal state is given, to understand their physical-chemical properties. The analysis of UV-VIS absorption spectra has shown the difficulty to obtain good reproducibility in terms of wavelengths and FWHH (full width half height) of plasmonic peaks for silver colloids synthesized with the Lee-Meisel (1982) method. As for the gold colloids, they have been synthesized with the Turkevich (1951) method, showing a very sharp diameter distribution of the nanoparticles in accordance with the original procedure. The silver colloids were centrifugated in order to demonstrate the possibility both to separate specific diameter fractions starting from the overall distribution and to increase the nanoparticles concentration. Centrifugation allows to obtain SERS enhancement factors higher than those achieved with as-prepared colloids not subjected to this process. Immobilization of nanoparticles on glass slides has been investigated as a mean to produce solid SERS substrates. By employing these concentrated colloids and solid substrates the detection of apomorphine in aqueous solutions is possible even at very low concentrations. For the solid substrates the detection limit achieved is 10^{-8} M, while for the concentrated colloids the limit reaches 10^{-9} M. Further studies on the reproducibility of malachite-green SERS signals imply that semi-quantitative analysis is not prohibitive. Finally the detection of apomorphine in human plasma at a concentration level achieved in high dosage conditions [10^{-4} M] *Manson (2001)* is possible combining the SERS effect with TLC (Thin Layer Chromatography) technique. In fact, after separation of apomorphine from plasma along the stationary phase, SERS signals of the drug molecule were registered by depositing some drops of concentrated colloids on a TLC slab.

Keywords: Raman spectroscopy; Surface Enhanced Raman Scattering; SERS; metallic nanoparticles; colloids centrifugation; TLC; apomorphine.

Introduzione

Il SERS (Surface Enhanced Raman Scattering), sviluppatosi a partire dalla metà degli anni '70, è una tecnica importante per la rilevazione di analiti a bassissima concentrazione, che permette di ricavare spettri Raman di molecole adsorbite in corrispondenza di superfici metalliche. Per generare effetto SERS sono necessari tre attori fondamentali: *l'analita* da rilevare, una *superficie metallica nanostrutturata* su cui l'analita deve legarsi chimicamente, e una *linea eccitatrice laser* in corrispondenza della risonanza plasmonica della superficie metallica.

In particolare, con il termine *superficie metallica nanostrutturata* si intende tutta una serie di substrati in grado di produrre forti innalzamenti dei campi elettromagnetici quando i loro elettroni di conduzione interagiscono con un laser. Queste superfici vanno dagli elettrodi impiegati nell'ambito elettrochimico fino a sistemi planari ordinati (arrays) ottenuti tramite tecniche nanolitografiche, per arrivare infine ai colloidi di oro e argento che sono oggi tra i substrati più utilizzati. Il forte impiego dei colloidi metallici per produrre effetto SERS è dettato infatti dalla facilità e rapidità della loro preparazione, oltre alla possibilità di modificarne le proprietà elettro-ottiche con una certa facilità.

Tuttavia l'impiego che trovano i colloidi metallici negli esperimenti SERS non è sempre proporzionato alla comprensione e allo sfruttamento delle loro caratteristiche. Spesso infatti gli step di sintesi, caratterizzazione e impiego dei colloidi devono essere gestiti a seconda delle particolari condizioni sperimentali da affrontare, e in molti casi questa gestione risulta fondamentale per la buona riuscita dell'analisi. Risulta a questo scopo importante conoscere le proprietà del colloide impiegato, soprattutto in termini di distribuzione dei diametri delle nanoparticelle che lo compongono e del suo picco di assorbimento plasmonico, al fine di massimizzare la risonanza con una data eccitatrice.

Un altro aspetto che gioca a favore dell'impiego dei colloidi metallici è la possibilità di immobilizzare su vetro le nanoparticelle, permettendo la formazione di veri e propri multilayer metallici. In questo modo è possibile ottenere un substrato solido nanostrutturato in grado, al pari delle nanoparticelle in soluzione, di legarsi con molecole di analita depositate e di generare effetto SERS. Ciò consente inoltre di effettuare dei mapping Raman del substrato solido funzionalizzato e di studiare le eventuali proprietà di riproducibilità dei segnali ottenibili in queste particolari

condizioni di analisi.

Infine la possibilità di produrre colloidali concentrati tramite centrifugazione permette di abbassare ulteriormente il limite di rilevazione rilevabile, aprendo le porte a tutta una serie di sbocchi applicativi riguardanti molti settori che oggi costituiscono la frontiera della tecnica SERS, come quello biomedico. Con questo scopo alle potenzialità del SERS è stata abbinata la tecnica della TLC (Thin Layer Chromatography), al fine di verificare la possibile rilevazione dei segnali Raman del farmaco dopo che esso è stato separato da un fluido corporeo come il plasma. L'ottenimento di questo risultato ha permesso il riconoscimento del principio attivo del farmaco somministrato nonostante le basse concentrazioni con cui viene somministrato e la forte interazione che instaura con alcune componenti del plasma stesso.

Questo lavoro di tesi risulta così suddiviso:

- Nei primi due capitoli sono illustrati i principi, le proprietà e le potenzialità che caratterizzano la spettroscopia Raman in generale e il SERS in particolare.
- Il terzo capitolo riguarda la strumentazione utilizzata nel corso delle prove sperimentali, vale a dire gli spettrometri Raman dispersivi e a trasformata di Fourier e lo spettrometro UV-VIS.
- Nel quarto capitolo, dopo un'introduzione sulle caratteristiche dei sistemi colloidali in fase acquosa, sono approfonditi gli aspetti legati alla sintesi e alle distribuzioni in termini di dimensioni delle nanoparticelle di oro e argento. Il capitolo prosegue con le analisi teoriche e sperimentali sulla centrifugazione e termina con la trattazione dell'immobilizzazione delle nanoparticelle metalliche su substrati vetrosi.
- Il quinto capitolo è interamente dedicato alla rilevazione SERS dell'apomorfina, il principio attivo farmaceutico che si è deciso di studiare e utilizzato nel trattamento del morbo di Parkinson. In particolare per questa molecola si è studiata la rilevazione SERS attraverso colloidali concentrati per centrifugazione e/o aggregati, la riproducibilità e la cinetica del suo segnale SERS in soluzione acquosa, e la sua detezione su substrati solidi di nanoparticelle immobilizzate.

- Nel corso del sesto capitolo si vuole fornire un taglio applicativo alle analisi effettuate, verificando la possibilità di effettuare la rilevazione dell'apomorfina all'interno del plasma umano quando essa raggiunge una molarità confrontabile con quelle terapeutiche di somministrazione.

Capitolo I

Spettroscopia Raman

1.1 Raman scattering [Castiglioni (1992), Zerbi (1992)]

La spettroscopia Raman sfrutta un fenomeno fisico di diffusione della luce scoperto nel 1928 da Chandrasekhara Venkata Raman. Egli usando la luce solare come sorgente, un telescopio come collettore e una lastra fotografica come detettore, scoprì che una piccola frazione della radiazione diffusa da certi materiali aveva energia diversa da quella incidente, e che la differenza di energia era legata alla composizione chimica del materiale. Questo fenomeno è sfruttato nei moderni strumenti Raman in cui la sorgente di luce è solitamente un fascio laser.

Se si considera un fascio laser che incide su un campione, è possibile osservare la diffusione da parte di quest'ultimo di linee spettrali a frequenze maggiori, minori e uguali rispetto alla frequenza della linea eccitatrice, come riportato in figura 1.

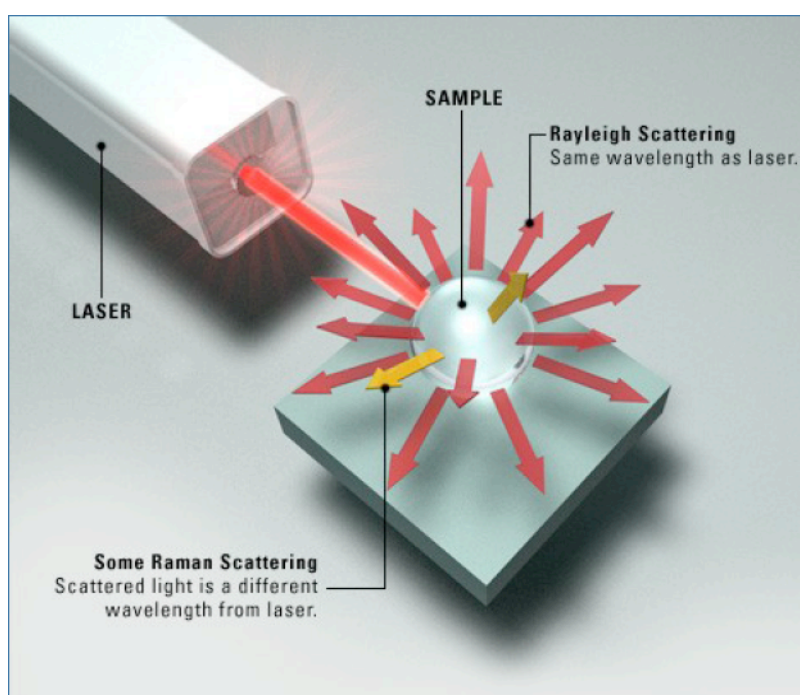


Figura 1. Il fascio laser, colpendo il campione, causa l'emissione da parte del materiale di linee spettrali a lunghezze d'onda sia uguali (Rayleigh scattering) che differenti (Raman scattering) rispetto a quella incidente.

Quando la frequenza della luce diffusa è la stessa di quella incidente si parla di scattering Rayleigh oppure rispettivamente di scattering Raman Stokes o Raman anti-Stokes nel caso di frequenze minori o maggiori. Lo scattering Rayleigh, che rappresenta di gran lunga il maggiore contributo nel processo diffusivo a causa della sua alta probabilità, è quindi caratterizzato dall'assenza di scambio di energia tra molecola e fotone, e per questo motivo è chiamato anche scattering "elastico". D'altra parte invece gli scattering Stokes e anti-Stokes sono caratterizzati da una diffusione di tipo "anelastico": la molecola rispettivamente cede o acquisisce energia vibrazionale per quanti discreti interagendo con la radiazione laser incidente. È proprio a causa dei fenomeni anelastici di interazione che è possibile ricavare informazioni dettagliate sugli stati vibrazionali del materiale che diffonde la radiazione, arrivando ad ottenere delle vere e proprie "impronte digitali" delle molecole. Per analizzare a questo punto l'effetto Raman occorre partire da una descrizione classica del fenomeno per passare poi ad una quantistica.

1.2 Descrizione classica dell'effetto Raman

Considerando le vibrazioni di una molecola biatomica eteronucleare, essa può essere rappresentata da due masse m_1 e m_2 legate tra loro da una molla di costante elastica K (figura 2).

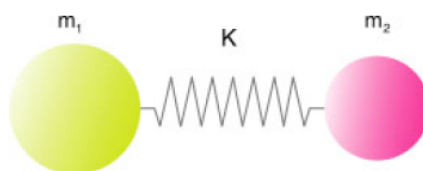


Figura 2. Rappresentazione di una generica molecola biatomica, con masse m_1 e m_2 , tenute assieme da un legame chimico schematizzato da una molla di costante elastica K .

Il potenziale intramolecolare usato per descrivere il legame chimico di questa molecola è mostrato in figura 3.

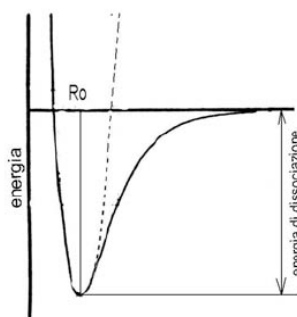


Figura 3. Andamento del potenziale per una molecola biatomica in funzione della distanza R tra gli atomi. L'energia di dissociazione è quel valore di energia tale per cui i due atomi sono posti ad una distanza infinita.

Come si può vedere dalla linea tratteggiata, l'andamento del potenziale nell'intorno della distanza di equilibrio R_0 può essere approssimato a quello di una parabola (potenziale armonico). Ciò permette di semplificare la trattazione delle piccole oscillazioni attorno a R_0 , considerandola simile a quella utilizzata per descrivere il comportamento di un oscillatore armonico di costante elastica K e di massa ridotta m_r . Successivamente, nel paragrafo dedicato alla trattazione quantistica del fenomeno, si toglierà l'ipotesi di armonicità considerando un potenziale anarmonico, in grado di descrivere in maniera più accurata il fenomeno vibrazionale.

Il potenziale armonico che viene quindi preso come riferimento per la trattazione classica dell'effetto Raman ha un andamento come quello riportato in figura 4, dove ora è definito in funzione dello scostamento $r = R - R_0$ rispetto all'equilibrio.

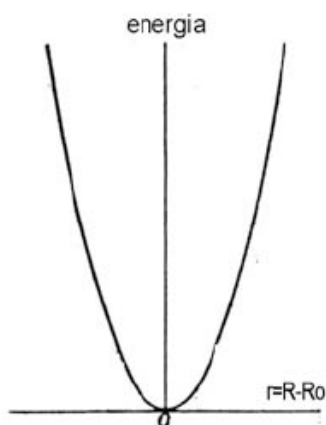


Figura 4. Potenziale armonico descritto in funzione dello scostamento r dall'equilibrio, definito come $R - R_0$.

Partendo quindi dallo sviluppo in serie di Taylor del potenziale:

$$V(r) = V(R) - V(R_0) = r \cdot (dV/dR)_{R_0} + 1/2 \cdot r^2 \cdot (d^2V/dR^2)_{R_0} + \dots \quad (1)$$

in virtù del fatto di aver centrato la parabola nella posizione di equilibrio si ha che $r = R - R_0 = 0$ e quindi l'espressione assume la forma:

$$V(r) = 1/2 \cdot K \cdot r^2 \quad (2)$$

con la costante elastica K che risulta uguale alla derivata seconda del potenziale rispetto a R calcolata nel punto di equilibrio R_0 :

$$K = (d^2V/dR^2)_{R_0} \quad (3)$$

Introducendo ora la massa ridotta della molecola m_r :

$$m_r = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (4)$$

si arriva a definire l'equazione del moto per l'oscillatore armonico:

$$m_r \ddot{r} = -\left(\frac{dV}{dr}\right) = -Kr \quad (5)$$

Tale equazione fornisce come soluzioni:

$$r = A \cdot \cos(2\pi \cdot \nu \cdot t) \quad (6)$$

$$\text{con } \nu = \frac{1}{2 \cdot \pi} \cdot \sqrt{\frac{K}{m_r}} \quad (7) \quad \text{e} \quad A = \sqrt{\left(\frac{2 \cdot E_{\text{tot}}}{K}\right)} \quad (8)$$

dove ν e A rappresentano rispettivamente frequenza ed ampiezza delle oscillazioni, mentre E_{tot} l'energia totale, somma di quella cinetica e potenziale del sistema.

Considerando ora un campo elettrico incidente sulla molecola biatomica l'interazione che si instaura causa la formazione di un momento elettrico dipolare indotto $\Delta\mu = \alpha \cdot E$ (9) dove α è un tensore di polarizzabilità molecolare, che tiene conto della tendenza della molecola ad essere polarizzata, cioè a modificare la distribuzione della propria nube elettronica quando sottoposta ad un campo elettrico. L'espressione del campo elettrico E associato ad un fascio laser di pulsazione incidente ω_L sulla molecola assume la forma:

$$E = E_0 \cdot \cos(\omega_L \cdot t) \quad (10)$$

Sostituendo la (10) nella (9) si ha che:

$$\Delta\mu = \alpha \cdot E_0 \cdot \cos(\omega_L \cdot t) \quad (11)$$

Introducendo ora la frequenza di vibrazione molecolare ω_m , una generica coordinata vibrazionale Q può essere espressa secondo un andamento del tipo:

$$Q = Q_0 \cdot \cos(\omega_m \cdot t) \quad (12)$$

Sviluppando in serie di Taylor la polarizzabilità in funzione di questa generica coordinata vibrazionale e utilizzando la (12), si ottiene la seguente espressione:

$$\alpha = \alpha_0 + (\partial \alpha / \partial Q) \cdot Q + \dots = \alpha_0 + (\partial \alpha / \partial Q) \cdot Q_0 \cdot \cos(\omega_m \cdot t) \quad (13)$$

Inserendo ora la (13) nella (11) si ottiene:

$$\Delta \mu = \alpha_0 \cdot E_0 \cdot \cos(\omega_L \cdot t) + (\partial \alpha / \partial Q) \cdot Q_0 \cdot E_0 \cdot \cos(\omega_m \cdot t) \cdot \cos(\omega_L \cdot t) \quad (14)$$

Utilizzando la formula trigonometrica di Werner:

$$\cos(\alpha) \cdot \cos(\beta) = \frac{1}{2} \cdot \{ \cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta) \} \quad (15)$$

si ottiene l'espressione finale per il momento dipolare indotto dalla radiazione incidente:

$$\Delta \mu = \alpha_0 \cdot E_0 \cdot \cos(\omega_L \cdot t) + \frac{1}{2} \cdot (\partial \alpha / \partial Q) \cdot Q_0 \cdot E_0 \cdot \{ \cos(\omega_L - \omega_m) t + \cos(\omega_L + \omega_m) t \} \quad (16)$$

Dall'espressione (16) si dimostra quindi che il dipolo molecolare indotto dal campo oscilla a 3 frequenze distinte fra loro. La radiazione elettromagnetica riemessa a 3 frequenze diverse è dipendente sia dalla linea eccitatrice ω_L che dalle vibrazioni molecolari ω_m . In questa equazione i tre termini corrispondono rispettivamente allo scattering Rayleigh (ω_L), a quello Raman Stokes ($\omega_L - \omega_m$) e a quello Raman anti-Stokes ($\omega_L + \omega_m$).

Poiché per il campo elettrico E emesso dal dipolo oscillante vale la seguente relazione di proporzionalità:

$$E \propto (\partial^2 \mu / \partial t^2) \quad (17)$$

ed essendo l'intensità della radiazione elettromagnetica emessa proporzionale al modulo quadro del campo E, si hanno le seguenti relazioni di proporzionalità per le radiazioni Stokes e anti-Stokes:

$$I_{\text{Stokes}} \propto (\omega_L - \omega_m)^4 \cdot (\partial \alpha / \partial Q)^2 \cdot I_0 \quad (18)$$

$$I_{\text{antiStokes}} \propto (\omega_L + \omega_m)^4 \cdot (\partial \alpha / \partial Q)^2 \cdot I_0(\omega_L) \cdot \exp(-h \nu_m / kT) \quad (19)$$

Le equazioni (18) e (19) mostrano come una condizione necessaria per avere una transizione Raman attiva comporti che un particolare modo vibrazionale Q_i sia tale da produrre una variazione di polarizzabilità nell'intorno dell'equilibrio:

$$Q_i \text{ Raman attiva se } \left| \partial \alpha / \partial Q_i \right|_0 \neq 0 \quad (20)$$

Durante l'eccitazione quindi il momento di dipolo $\Delta \mu$ generato dal campo elettrico incidente E è modulato dalle vibrazioni molecolari, in quanto il tensore di polarizzabilità α è funzione delle coordinate stesse, come anticipato nella formula (13).

Tutti i $(3N-6)$ modi normali di vibrazione per la molecola, nell'ipotesi di piccole oscillazioni, possono essere trattati come oscillatori armonici indipendenti e disaccoppiati fra loro, in questo modo la (16) vale per tutte le coordinate Q_i della molecola e la frequenza di oscillazione comparirà nello spettro Raman in corrispondenza di un picco se almeno una delle componenti del tensore $\partial \alpha / \partial Q_i$ è diversa da 0.

Per meglio comprendere ora il significato del termine esponenziale all'interno della (19) occorre introdurre la trattazione quantistica dell'oscillatore armonico.

1.3 Descrizione quantistica dell'effetto Raman

La trattazione quantistica dell'oscillatore armonico prevede, a differenza di quella classica, la possibilità di fornire solo quanti discreti di energia dal valore $\Delta E = h\nu$, con ν frequenza dell'oscillatore e h costante di Planck. Le energie permesse per tale oscillatore quantistico, corrispondenti ai livelli vibrazionali con numero quantico ν ($\nu = 0, 1, 2, \dots$) variano secondo la relazione:

$$E_\nu = (\nu + 1/2) \cdot h \nu \quad (21)$$

Nell'ipotesi di oscillatore armonico i livelli sono quindi equispaziati e sono permessi salti vibrazionali solo fra livelli adiacenti ($\Delta \nu = \pm 1$), di conseguenza il potenziale armonico classico, riportato precedentemente in figura 4, assume una ora rappresentazione come quella della figura 5.

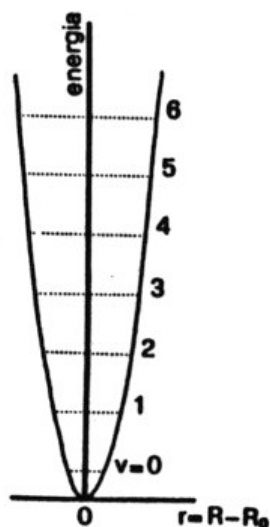


Figura 5. Oscillatore armonico quantizzato. I valori di v sulla scala delle ordinate indicano livelli vibrazionali crescenti.

Dal punto di vista quantistico quindi lo scattering Raman può essere descritto dallo schema a livelli energetici vibrazionali ed elettronici riportato in figura 6, dove all'interno dello stato ground elettronico g sono evidenziati due livelli vibrazionali $v = 0$ e $v = 1$.

Nel caso dello scattering Raman quando un fotone di energia $h\nu_0$ colpisce il campione la molecola passa ad uno stato virtuale instabile (non stazionario) m' o m , da cui poi decade in modo spontaneo e rapido.

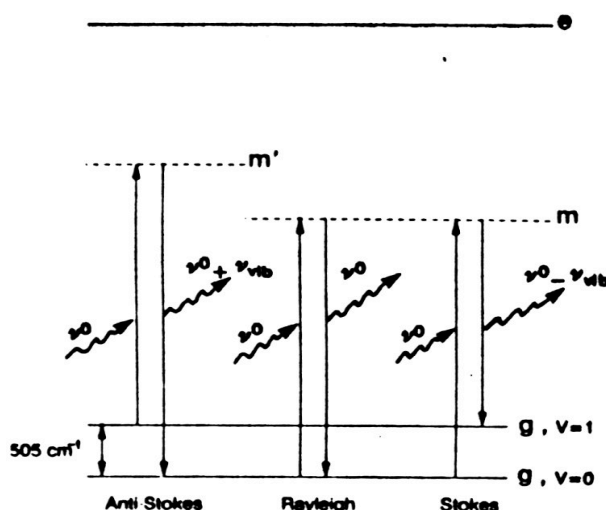


Figura 6. Livelli energetici elettronici reali (g ed e), virtuali (m' e m) e livelli vibrazionali ($v = 1$ e $v = 2$) per una molecola che riceve una radiazione incidente con frequenza ν_0 .

A questo punto è possibile definire i 3 contributi che si creano quando una radiazione elettromagnetica colpisce una molecola, come è stato anticipato discutendo l'equazione (16):

- **Scattering Rayleigh:** la molecola riemette un fotone con la stessa frequenza di quello incidente ν_0 , ritornando allo stato elettronico fondamentale g .
- **Scattering anti-Stokes:** la molecola ricade in un livello vibrazionale inferiore $v = 0$ da quello iniziale $v = 1$, emettendo un fotone con frequenza maggiore: $\nu_0 + \nu_{\text{vib}} = \nu_{\text{antiStokes}}$
- **Scattering Stokes:** la molecola ricade in un livello vibrazionale superiore $v = 1$ da quello iniziale $v = 0$, emettendo un fotone con frequenza minore: $\nu_0 - \nu_{\text{vib}} = \nu_{\text{Stokes}}$

Come già accennato all'inizio del capitolo, poiché la stragrande maggioranza dei fotoni subisce scattering Rayleigh, è prevedibile che l'intensità della linea spettrale appartenente a questo contributo sia quella maggiore come mostrato nella figura 7, dove sono riportate anche le intensità relative ai contributi anelastici. Si definisce inoltre Raman-shift la differenza tra la frequenza della linea eccitatrice e la frequenza della radiazione riemessa. Per quanto detto tale shift è riconducibile in maniera precisa ad un dato modo vibrazionale della molecola.

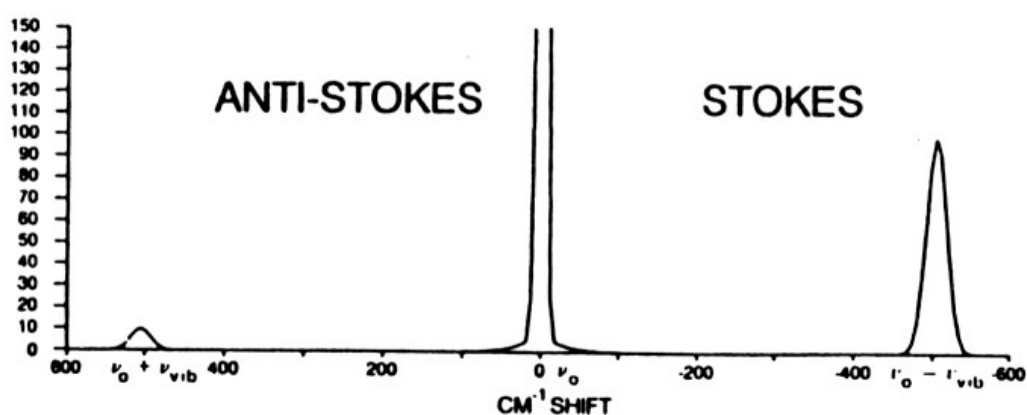


Figura 7: Intensità relative e frequenze di una radiazione elettromagnetica diffusa da una molecola: da notare la completa simmetria degli shift Stokes e anti-Stokes rispetto alla diffusione Rayleigh.

Sempre dalla figura 7 si nota che l'intensità del contributo Stokes è molto maggiore di quella anti-Stokes: ciò è spiegabile considerando la distribuzione di Boltzmann e lo schema a livelli di figura 6: per avere scattering anti-Stokes infatti è necessario sia popolato lo stato vibrazionale eccitato $v = 1$. Dalla statistica di Boltzmann è noto che il rapporto fra due popolazioni in due stati vibrazionali N_1 e N_0 , corrispondenti ai livelli $v = 1$ e $v = 0$ rispettivamente, ha la seguente relazione esponenziale:

$$\frac{N_1}{N_0} = \exp(-\Delta E/kT) \quad (22)$$

dove ΔE indica la spaziatura energetica tra i livelli vibrazionali, T la temperatura e k la costante di Boltzmann. Per valori di temperatura simili a quella ambiente la popolazione N_1 è trascurabile rispetto a quella dello stato ground N_0 , giustificando quindi la presenza in figura 7 di intensità molto minori relativamente allo scattering anti-Stokes. La ripartizione di molecole secondo Boltzmann rimane valida finché il pompaggio Raman sul livello vibrazionale $v = 1$ è trascurabile rispetto al tempo di vita medio del primo livello vibrazionale, fenomeno non sempre rispettato nell'effetto SERS. La (22) inoltre permette, conoscendo il rapporto fra le popolazioni, di ricavare in maniera estremamente precisa il valore della temperatura del campione, sfruttando in questo modo l'effetto Raman come termometro “a distanza”.

Finora si è considerato per semplicità di trattazione un potenziale quantizzato armonico, tuttavia questo tipo di potenziale risulta un'approssimazione, in quanto si possono avere nella realtà anche salti vibrazionali maggiori di 1. Per una trattazione del fenomeno meno approssimata occorre quindi introdurre un potenziale anarmonico come quello di Morse, riportato in figura 8.

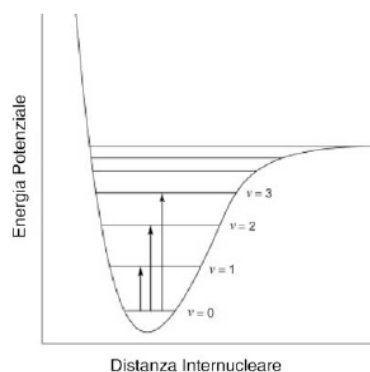


Figura 8. Potenziale di interazione anarmonico, in cui sono evidenziati livelli vibrazionali non più equispaziati e salti vibrazionali $\Delta v > 1$.

Come mostrato dalla figura 8 in questo caso i livelli vibrazionali della molecola non sono più equispaziati, ma tendono ad infittirsi per v crescenti, ed inoltre sono permessi salti vibrazionali maggiori di 1. L'andamento di questo potenziale può essere descritto dalla seguente funzione:

$$V = D(1 - e^{-a \cdot r})^2 \quad (23)$$

in cui D è la profondità del minimo di potenziale, r è lo scostamento dall'equilibrio ($R - R_0$), mentre a

è uguale a $\sqrt{(K/2D)}$ con K costante di forza della molla. La spaziatura dei livelli vibrazionali assume in questo caso una forma del tipo:

$$E_v = [(v + 1/2) - f(v + 1/2)^2] \cdot h\nu \quad (24)$$

in cui $f = h\nu/4D$ è detta costante di anarmonicità.

Il potenziale di Morse è utilizzato solitamente per descrivere molecole le cui geometrie vibrando si discostano molto rispetto alla posizione di minima energia; viceversa per molecole più “rigide” è ancora possibile utilizzare il potenziale armonico che, non a caso, con il suo andamento parabolico nell'intorno della posizione di equilibrio (*cf.* figura 3, paragrafo 1.2), approssima bene il comportamento più generale del potenziale di Morse .

1.4 Raman Risonante

Quando la linea eccitatrice è tale che l'energia dei fotoni incidenti sia maggiore dell'energia richiesta per effettuare una transizione elettronica si ha l'effetto Raman Risonante. In questo modo la corrispondenza del livello virtuale m con un livello eccitato effettivo del sistema aumenta l'efficienza dello scattering, incrementando cioè il numero di fotoni emessi per effetto Raman, con la conseguenza che per le particolari transizioni in risonanza le bande Raman corrispondenti risultano fortemente intensificate. La molecola non è comunque portata su un livello elettronico eccitato reale, altrimenti si rientrerebbe nel fenomeno della fluorescenza (figura 9).

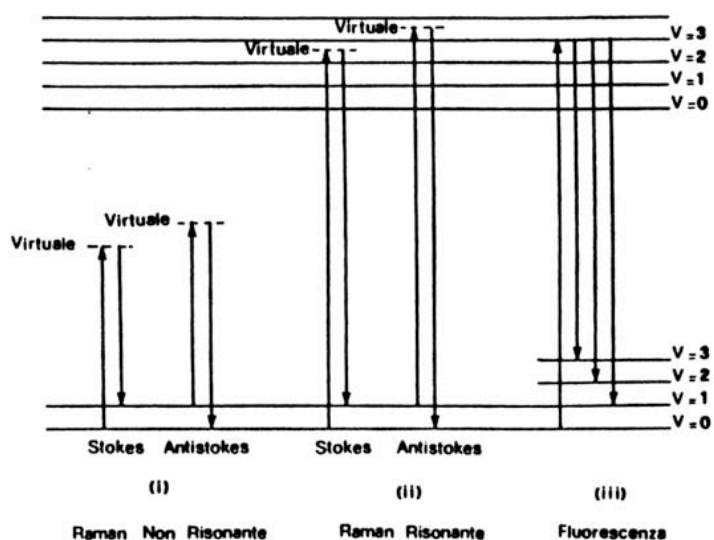


Figura 9. Nel fenomeno del Raman risonante la molecola non raggiunge un livello elettronico reale come invece si verifica nel caso della fluorescenza.

Una conferma della diversa natura che intercorre tra Raman Risonante e fluorescenza è fornita dai tempi caratteristici dei due processi, nettamente diversi fra loro: il tempo di decadimento dallo stato eccitato per effetto Raman è molto breve, dell'ordine di 10^{-14} s, mentre quello della fluorescenza si trova tra i 10^{-8} e i 10^{-5} s. Le bande Raman che si originano sono selettivamente intensificate di un fattore che può arrivare a 10^5 . La selettività dell'intensificazione può inoltre essere molto utile nel caso si volesse intensificare solo il segnale di alcune bande, corrispondenti a un particolare cromoforo presente nella molecola studiata, che assorbe proprio intorno alla frequenza eccitatrice.

Capitolo II

SERS (Surface Enhanced Raman Scattering)

2.1 Introduzione [Etchegoin (2009)]

L'effetto SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) consiste in un'intensificazione di diversi ordini di grandezza del segnale Raman di una molecola: tale intensificazione è dovuta all'interazione fra l'onda elettromagnetica associata al laser utilizzato e un substrato metallico su cui l'analita è posto. Analizzando le parole che compongono l'acronimo è possibile caratterizzare più in dettaglio le proprietà che definiscono questo effetto:

Surface (S): il SERS è una tecnica spettroscopica di superficie. La molecola da analizzare deve essere adsorbita sul metallo oppure essere molto vicina ad esso, in modo tale che l'intensità elettromagnetica del campo, che decresce in maniera sensibile con la distanza, non sia eccessivamente ridotta.

Enhanced (E): l'amplificazione del campo elettromagnetico è dovuta alle risonanze plasmoniche generate dalla superficie metallica. Come sarà mostrato i massimi valori di enhancement si ottengono su superfici nanostrutturate.

Raman (R): la tecnica prevede un'intensificazione dei segnali Raman. Le posizioni delle bande caratteristiche negli spettri SERS saranno quindi esattamente uguali a quelle dei corrispettivi spettri Raman*, fornendo lo stesso grado di informazioni sulla struttura chimica del materiale analizzato, ma dando al contempo la possibilità di effettuare analisi a concentrazioni altrimenti improponibili utilizzando il solo effetto Raman.

Scattering (S): con questo termine si ricorda che la natura del processo è (analogamente al caso del Raman) quella di una diffusione anelastica mediata dai modi vibrazionali caratteristici dell'analita.

* A meno di effetti di solvente o di interazioni chimiche con il substrato metallico che possono modificare la struttura vibrazionale dell'analita.

Il fenomeno fu osservato per la prima volta nel 1974 da Fleischmann, il quale ottenne un segnale Raman intensificato della piridina adsorbita su un elettrodo di argento, reso rugoso allo scopo di aumentare la superficie disponibile e quindi il numero di molecole adsorbite. Tre anni dopo Jeanmaire e Van Duyne ed indipendentemente Albrecht e Creighton capirono che la grande intensità del segnale osservato da Fleischmann non era attribuibile solamente al maggior numero di molecole scatteranti: proposero allora un meccanismo di intensificazione dello stato adsorbito. Curiosamente i due gruppi di lavoro differenziarono le loro interpretazioni già presagendo il futuro (e in parte ancora attuale) dibattito sui reali meccanismi di intensificazione del segnale Raman. Jeanmaire e Van Duyne sostennero un meccanismo di intensificazione legato essenzialmente al campo elettromagnetico in prossimità della superficie di argento, mentre Albrecht e Creighton interpretarono i propri risultati come dovuti a una sorta di Raman Risonante di stati elettronici molecolari modificati dalla superficie metallica. Come sarà mostrato nei paragrafi seguenti entrambi i meccanismi di enhancement entrano in gioco nell'intensificazione globale del segnale Raman, anche se con pesi diversi.

Per avere ora un'idea della potenzialità di questa tecnica si riportano in figura 1 due spettri del Crystal Violet (CV), un colorante che presenta un effetto SERS molto marcato. Nello spettro in grigio si mostra uno spettro Raman del colorante misurato ad una concentrazione di 10^{-3} M, mentre quello in rosso, misurato ad una concentrazione di 10^{-6} M in presenza di nanoparticelle di argento, mostra l'effetto SERS che la molecola è in grado di subire. Il SERS è in grado di elevare i segnali delle bande caratteristiche di molti ordini di grandezza, dando la possibilità di ottenere la rilevazione di analiti anche a bassissima concentrazione, fuori dal campo di applicabilità del Raman.

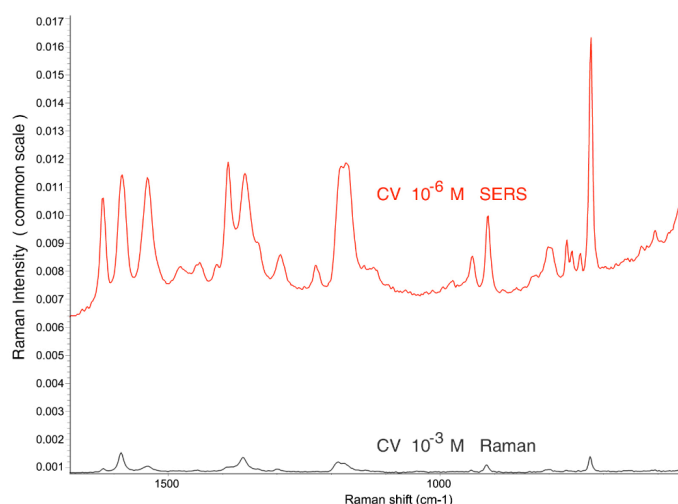


Figura 1. Spettri a differenti concentrazioni del Crystal Violet: in quello rosso si ha l'azione dell'effetto SERS per mezzo di nanoparticelle di argento.

2.2 Substrati SERS [Etchegoin (2009)]

Le tre principali classi di substrati metallici attraverso i quali è possibile ottenere l'effetto SERS sono gli elettrodi, le superfici planari ordinate e le nanoparticelle.

- Elettrodi: sono i primi substrati ad essere stati utilizzati con la scoperta dell'effetto SERS, che nacque infatti come una disciplina legata all'ambito elettrochimico. Nonostante sino stati approntate tecniche di ossidoriduzione con le quali è possibile renderli rugosi aumentando fino a livello nanometrico la loro struttura frattale, il loro impiego è sostanzialmente diminuito nel corso degli anni a causa dei bassi valori di enhancement ottenibili.
- Superfici planari ordinate: con l'avvento e lo sviluppo delle nanotecnologie si è assistito ad un grande sviluppo di strutture (arrays) di particelle metalliche supportate da substrati di vetro o silicio, ottenibili principalmente tramite tecniche di tipo litografico. Questi substrati se da un lato permettono di ottenere misure SERS con una buona riproducibilità, dall'altro hanno un impiego ancora limitato a causa degli elevati costi di processo, che comunque non hanno impedito recentemente una loro introduzione su scala industriale*.
- Nanoparticelle: le nanoparticelle metalliche che formano le soluzioni colloidali sono le superfici di gran lunga più utilizzate per ottenere l'effetto SERS: anche dopo l'avvento delle superfici ordinate infatti, i colloidali continuano ad essere impiegati diffusamente a causa della semplicità di sintesi e dei costi irrisori di produzione se paragonati a quelli dei substrati ordinati. Inoltre al variare dei parametri di sintesi è possibile modulare forma e dimensioni delle particelle spostando così il picco di assorbimento plasmonico. In questo modo è possibile modulare a piacimento le proprietà di assorbimento del colloide.

I metalli di gran lunga più utilizzati per misure SERS sono l'oro e l'argento a causa delle loro proprietà ottiche, in quanto entrambi presentano risonanze plasmoniche nel range VIS-NIR, dove cioè cadono le principali lunghezze d'onda dei laser impiegati e la risonanza ottenibile è quindi massima. Recentemente sono state studiate in maniera approfondita le proprietà di assorbimento plasmonico di altri metalli come il rame, il palladio e il platino che però non hanno dato risultati in termini di enhancement all'altezza dei primi due. Si mostrano ora le particolari proprietà ottiche di oro e argento che sono alla base del meccanismo di enhancement elettromagnetico.

* Per ulteriori informazioni si rimanda al seguente indirizzo web: <http://www.renishawdiagnostics.com/en/10451.aspx>

2.3 Il modello di Drude e la risposta ottica dei metalli [Etchegoin (2009)]

Il modello di Drude si basa sulla trattazione di Lorentz per la polarizzabilità atomica: essa descrive la risposta ottica di un elettrone in un atomo legato attraverso una forza di richiamo caratterizzata da una frequenza di risonanza ω_0 . Poiché gli elettroni di conduzione in un metallo non sono però legati è possibile, in prima approssimazione, semplificare la trattazione di Lorentz considerando nulla la forza di richiamo che il nucleo positivo esercita sull'elettrone, portando in questo modo ad avere $\omega_0 = 0$. Mediante questa semplificazione è possibile scrivere la funzione dielettrica di Drude relativa ad un metallo come:

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

dove n è il numero di elettroni per unità di volume, m la loro massa ed e la loro carica. La costante di smorzamento γ_0 , espressa in radianti al secondo, corrisponde al tasso di collisione degli elettroni liberi con il cristallo o le sue impurità, ed è di solito trascurabile rispetto a ω nelle regioni di interesse, mentre ε_0 è la costante dielettrica del mezzo. La risposta ottica degli ioni positivi è fin qui trascurata, ma il loro contributo può essere fatto rientrare nella costante dielettrica reale di background ε_∞ , sempre maggiore o uguale a 1, attraverso la quale la $\varepsilon(\omega)$ può essere riscritta come:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty \left\{ 1 - \frac{\omega_p^2}{(\omega^2 + i \gamma_0 \omega)} \right\} \quad (2) \quad \text{con} \quad \omega_p = \sqrt{\frac{n e^2}{m \varepsilon_0 \varepsilon_\infty}} \quad (3)$$

In assenza di un campo elettrico esterno la densità di carica del plasma di elettroni liberi è uniforme. ω_p rappresenta la frequenza naturale di oscillazione della densità di carica di un plasma a elettroni liberi, e per questo motivo è chiamata frequenza di plasma: al di sopra di tale frequenza il metallo passa da riflettente a trasparente. Prendendo ora la parte reale e immaginaria della (2), secondo l'espressione $\varepsilon = \varepsilon' + i \varepsilon''$ si ha che:

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty \left\{ 1 - \frac{\omega_p^2}{(\omega^2 + \gamma_0^2)} \right\} \quad (4) \quad \text{e} \quad \varepsilon''(\omega) = \varepsilon_\infty \left\{ \frac{\varepsilon_\infty \omega_p^2 \gamma_0}{\omega(\omega^2 + \gamma_0^2)} \right\} \quad (5)$$

Poiché γ_0 è trascurabile rispetto a ω , si nota che per un plasma descritto dal modello di Drude la frequenza di plasma ω_p può essere ottenuta dalla condizione $\varepsilon' \approx 0$. Inoltre nelle regioni dove la

frequenza è minore di quella di plasma si ha $\varepsilon' < 0$ e l'assorbimento, modulato da ε'' , è piccolo. Queste due condizioni permettono di ottenere interessanti effetti ottici, tra cui le risonanze plasmoniche. Per molti metalli, tra cui oro e argento, la frequenza di plasma cade nel range dell'UV e la regione di interesse è quindi quella del visibile.

Il modello di Drude descrive in maniera relativamente semplice la risposta ottica di un plasma, cioè in questo caso il comportamento degli elettroni liberi di conduzione di un metallo. Tali elettroni corrispondono però solamente a quelli che effettuano transizioni intra-banda, in quanto rimangono sempre nella banda di conduzione. In un metallo reale altri processi ottici hanno luogo e sono dovuti alle transizioni inter-banda, che si verificano quando elettroni legati sono promossi a bande di energia maggiore. Per tenere conto quindi di questo tipo di transizioni occorre riscrivere la (2) nella forma più generale:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_b(\omega) - \varepsilon_\infty \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_0\omega} \quad (5)$$

dove il termine $\varepsilon_b(\omega)$ rappresenta le transizioni inter-banda che coesistono con il contributo degli elettroni liberi dato dal secondo addendo.

Nel caso dell'argento le transizioni inter-banda avvengono nell'UV e il contributo alla costante dielettrica nel visibile è costante e reale. Ciò permette di porre $\varepsilon_b(\omega) = \varepsilon_\infty$ e quindi di ritornare all'espressione (2).

Nel caso dell'oro invece le transizioni inter-banda sono prossime alla frequenza di plasma e non possono essere trascurate, imponendo l'utilizzo della (5). Questo avviene perché $\varepsilon_b(\omega) \neq \varepsilon_\infty$ e le oscillazioni naturali degli elettroni liberi sono influenzate dalla presenza di queste transizioni.

Le costanti dielettriche dei metalli sono state ampiamente studiate nel corso degli anni, portando alla definizione di modelli accurati e di funzioni in grado di descrivere il loro comportamento al variare delle lunghezze d'onda dello spettro elettromagnetico.

Nei grafici di figura 2 si riportano i contributi reali e immaginari della funzione dielettrica per oro e argento: la presenza come detto delle transizioni inter-banda nel caso dell'oro è la principale causa dello scostamento della risposta rispetto all'argento. Si assiste infatti ad un aumento della parte reale nel range dove dovrebbe avvenire la risonanza plasmonica, spostandola quindi verso lunghezze d'onda maggiori rispetto all'argento, come sarà mostrato nel capitolo dedicato ai colloidi. Tuttavia l'effetto più importante è l'aumento netto della parte immaginaria al di sotto dei 600 nm, proporzionale all'assorbimento, che produce per questo motivo risonanze plasmoniche caratterizzate da una alta dissipazione di energia elettromagnetica in questo range. Ciò non è più valido per

lunghezze d'onda maggiori di 600 nm, dove infatti l'oro mostra proprietà plasmoniche comparabili a quelle dell'argento.

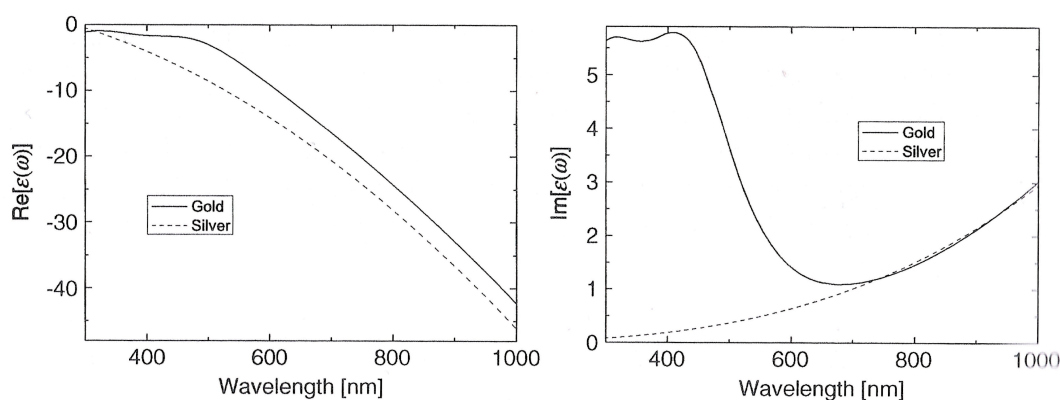


Figura 2. Parti reali e complesse delle costanti dielettriche di oro e argento in funzione delle lunghezze d'onda di interesse per applicazioni SERS.

2.4 Plasmoni [Etchegoin (2009), Lucotti (2005), Pesapane (2005)]

In questo paragrafo si vuole definire il concetto di plasmone, fino ad ora menzionato ma non trattato specificamente, con un accenno a come le sue caratteristiche influenzano le proprietà ottiche delle nanoparticelle.

Come già anticipato gli elettroni di conduzione nei metalli sono debolmente legati agli atomi: ciò rende possibile, sotto l'azione di una radiazione elettromagnetica, produrre significative variazioni di densità di carica rispetto al valore medio. Queste rarefazioni e concentrazioni di carica elettronica, che creano forze elettriche volte naturalmente a ripristinare la neutralità, se sono nel bulk vengono dette “onde di plasma”, mentre se sono localizzate sulla superficie vengono denominate “plasmoni di superficie”. Nel caso particolare delle nanoparticelle metalliche il campo elettrico dell'onda penetra e attraversa la particella, che ha dimensioni minori della lunghezza d'onda della radiazione, spostando in questo modo collettivamente gli elettroni di conduzione rispetto ai nuclei atomici considerati fissi, come schematizzato in figura 3.

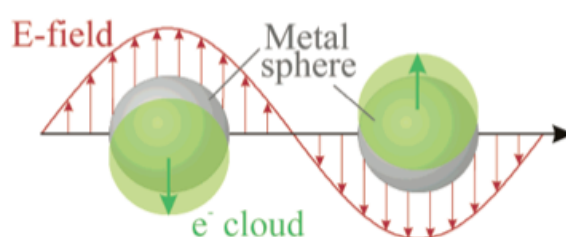


Figura 3. Spostamento della nube elettronica (e- cloud) rispetto alla posizione del nucleo dopo l'interazione con un campo elettromagnetico incidente E.

Si viene così a creare uno squilibrio di carica elettrica tra la superficie e l'interno della particella che dà origine alla forza di richiamo. Se la frequenza della radiazione incidente entra in risonanza con queste oscillazioni collettive allora anche un debole campo elettrico può portare a forti oscillazioni, creando i plasmoni di superficie, che in questo caso diventano appunto risonanti. Si crea quindi in questo modo un dipolo oscillante in grado di rimettere un campo elettromagnetico nel mezzo in cui la nanoparticella è posta.

Da quanto detto si comprende quindi che, al fine di massimizzare l'enhancement, occorre entrare in risonanza con i plasmoni di superficie delle nanoparticelle utilizzate per ottenere l'effetto SERS. Ciò comporta l'utilizzo di una sorgente laser che abbia una lunghezza d'onda caratteristica il più possibile vicina al picco di risonanza plasmonica della nanoparticella.

È importante notare che l'ampiezza e la frequenza di tali oscillazioni plasmoniche, che influiscono direttamente sulle proprietà ottiche, dipendono dalla forma, dalla dimensione, dal tipo di metallo utilizzato e dal mezzo che circonda le nanoparticelle [Cobley (2009)]. Senza entrare nei dettagli in figura 4, si mostrano varie geometrie di nanoparticelle di argento, ottenibili in soluzione al variare dei parametri operativi e i relativi picchi di risonanza plasmonica. Nella figura gli spettri in rosso riportano il contributo di assorbimento, quelli in blu il contributo di scattering, mentre quelli in nero il contributo di estinzione, somma dei primi due.

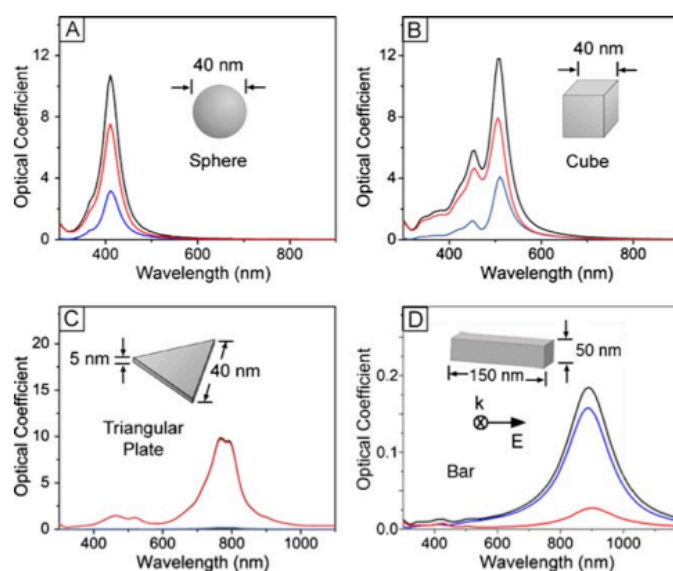


Figura 4. Picchi di risonanza plasmonica per varie geometrie di nanoparticelle di argento in soluzione acquosa.

In figura 5 si riporta un esempio della variazione del coefficiente di scattering al variare delle dimensioni delle nanoparticelle di argento in acqua per due geometrie fissate.

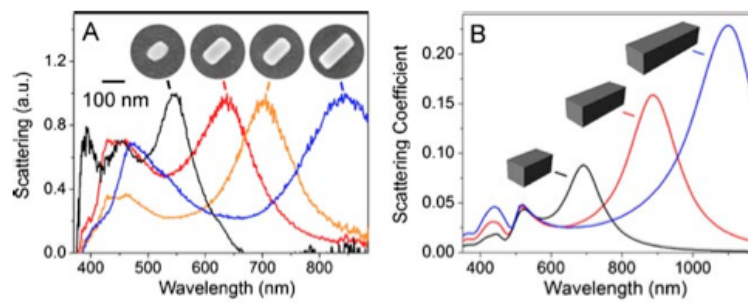


Figura 5. Al variare delle dimensioni delle nanoparticelle varia la posizione del picco di scattering.

Poiché quindi assorbimento e scattering hanno una dipendenza dalle dimensioni e dalla forma delle nanoparticelle si intuisce che anche il colore delle stesse varierà in funzione di questi due parametri. L'estinzione totale di una particella è dovuta alla somma del contributo di assorbimento e di quello di scattering: il primo è dato dai meccanismi di diseccitazione non radiativi che dissipano calore, mentre il secondo rende conto del meccanismo di decadimento radiativo dei plasmoni. Le funzioni che descrivono le sezioni d'urto che entrano in gioco quando una radiazione elettromagnetica interagisce con una particella dal diametro piccolo in confronto alla lunghezza d'onda sono note dalla letteratura [Kneipp (2001)]. Per quella di assorbimento esiste una dipendenza alla terza potenza del raggio, mentre per quella di scattering la proporzionalità arriva alla sesta potenza. Pertanto per particelle molto piccole (20 nm) è preponderante il contributo di assorbimento, ma all'aumentare delle dimensioni (100 nm) il contributo di scattering è sempre più importante (figura 6).

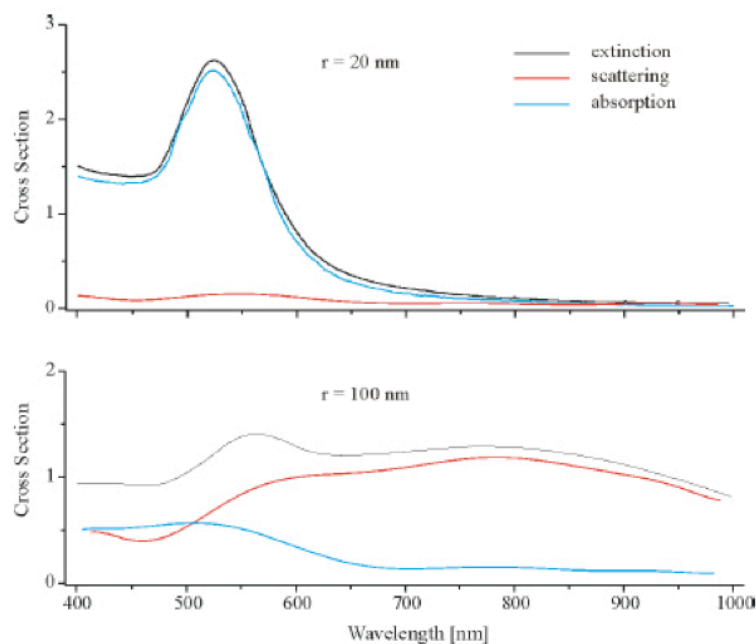


Figura 6. Per particelle da 20 nm l'estinzione è definita quasi interamente dal contributo di assorbimento, ma all'aumentare del raggio il contributo di scattering è sempre più importante.

I concetti fin qui esposti sulle proprietà ottiche delle nanoparticelle possono essere sintetizzati nel diagramma di figura 7, dove si mostra l'andamento della lunghezza d'onda λ_{Res} del picco di assorbimento plasmonico per acqua e aria, la parte reale della costante dielettrica (in valori negativi) $-\text{Re}(\epsilon_{Res})$ e il coefficiente di estinzione $Q(\epsilon_{Res})$ in aria, in funzione del raggio a di una nanoparticella sferica di argento.

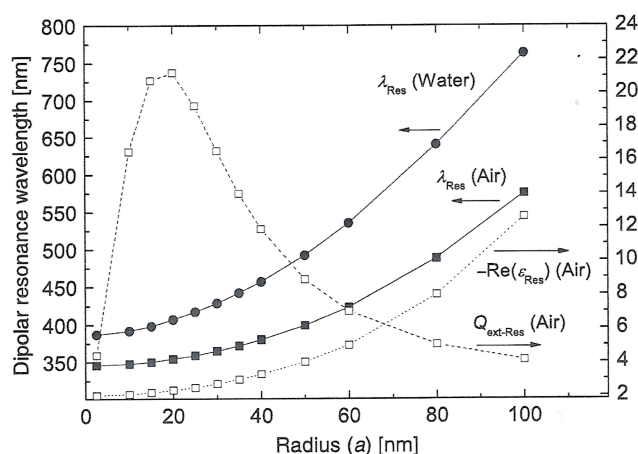


Figura 7. Variazione delle proprietà ottiche delle nanoparticelle di argento in funzione del loro raggio.

Dal grafico si nota innanzitutto che la lunghezza d'onda del picco plasmonico dipende dall'indice di rifrazione del mezzo in cui le nanoparticelle sono immerse, tale fenomeno verrà analizzato nel paragrafo seguente. Inoltre si ha conferma che anche piccole variazioni nella dimensione delle nanoparticelle hanno un'influenza importante sulle proprietà ottiche e in particolare sul colore delle stesse. All'aumentare del raggio infatti aumenta la lunghezza d'onda di risonanza plasmonica: questo comporta un red-shift del picco di assorbimento e anche un allargamento del picco stesso. È quindi scontato che al variare del contributo di assorbimento vari di pari passo anche il contributo di radiazione visibile all'occhio umano.

2.5 Enhancement elettromagnetico [Kneipp (2001), Etchegoin (2009)]

Il più importante contributo all'enhancement totale che si sviluppa nell'effetto SERS è dovuto ad un meccanismo di tipo elettromagnetico. Considerando una nanoparticella singola, il campo elettromagnetico che si sviluppa all'esterno di essa è dato dalla somma del campo incidente E_0 e del campo sviluppato dal dipolo oscillante in seguito all'eccitazione plasmonica E_{sp} . Indicando con E_M il campo totale è possibile quindi scrivere:

$$E_M = E_0 + E_{sp} \quad (6)$$

Secondo la trattazione che si andrà a sviluppare si trascureranno effetti di ritardo dovuti a campi autoindotti. In altre parole la trattazione sarà rigorosa per particelle con diametri fino a 40 nm, in modo tale che il rapporto del raggio rispetto alla lunghezza d'onda incidente sia minore del 5%. Nella regione di spazio dell'analisi quindi la fase del campo sarà costante e sarà possibile utilizzare l'elettrostatica standard per calcolare la risposta della particella.

La situazione da analizzare è riportata in figura 8, dove il raggio r della particella, caratterizzato da costante dielettrica complessa $\epsilon = \epsilon' + i\epsilon''$, è molto minore della lunghezza d'onda incidente. La molecola che subisce l'effetto SERS è posta ad una distanza d dalla superficie, ed è immersa in un mezzo di costante dielettrica ϵ_0 .

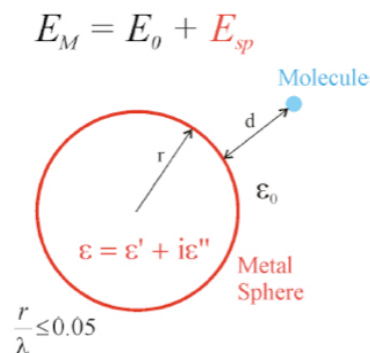


Figura 8. Schema di riferimento per la descrizione dell'enhancement elettromagnetico.

La sfera sottoposta all'azione del campo esterno sviluppa, come già anticipato precedentemente, una forza di richiamo E_{int} al suo interno dovuta alla formazione di un dipolo, come mostrato in figura 9.

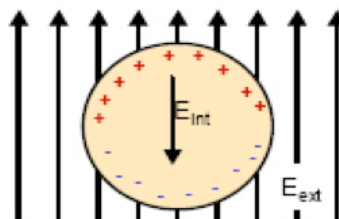


Figura 9. Modello quasi statico per una particella immersa in un campo elettrico esterno formante un dipolo.

Secondo la trattazione di Lorentz il campo elettrico E_{sp} che si genera all'esterno della particella ha la seguente espressione:

$$E_{sp} = r^3 \frac{\epsilon - \epsilon_0}{\epsilon + 2\epsilon_0} E_0 \frac{1}{(r+d)^3} \quad (7)$$

Dall'espressione si vede che il campo mostra una divergenza per valori tali per cui $\varepsilon' \approx -2\varepsilon_0$ e ε'' è trascurabile. Queste condizioni sono verificate nel range del visibile dall'oro e dall'argento, come già mostrato in figura 2. Alla luce dell'espressione (7) occorre quindi correggere il modello di Drude, in particolare la (4), ponendo la nuova condizione di risonanza:

$$-2\varepsilon_0 = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega} \quad (8) \quad \text{da cui si ricava} \quad \omega = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + 2\varepsilon_0}} \quad (9)$$

Riportando la (9) in lunghezze d'onda si ottiene:

$$\lambda = \lambda_p \sqrt{1 + 2\varepsilon_0} \quad (10)$$

che dimostra la dipendenza della lunghezza d'onda di assorbimento plasmonico della particella in funzione della costante dielettrica del solvente ε_0 in cui è immersa. Tuttavia i valori che si ottengono con la (10) non rispecchiano quelli reali, in quanto il modello di Drude non tiene in considerazione le transizioni inter-banda dei metalli. Occorre quindi correggere l'espressione introducendo una costante dielettrica ad alte frequenze ε_∞ che porta a scrivere:

$$\lambda = \lambda_p \sqrt{\varepsilon_\infty + 2\varepsilon_0} \quad (11)$$

I dati presenti in letteratura indicano per l'argento valori di circa 135 nm per la λ_p e 5,9 per la ε_∞ .

Tornando alla definizione di enhancement elettromagnetico è possibile considerare $E_{sp} \gg E_0$ e definire così un fattore di intensificazione adimensionale del campo $A(\omega)$:

$$A(\omega) = \frac{E_M(\omega)}{E_0(\omega)} \approx \frac{E_{sp}(\omega)}{E_0(\omega)} = \frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0} \cdot \left(\frac{r}{r+d} \right)^3 \quad (12)$$

Introducendo ora il fattore di intensificazione per l'intensità $I(\omega)$ come il modulo di $A(\omega)$ elevato al quadrato, si ottiene:

$$I(\omega) = |A(\omega)|^2 \approx \left| \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \cdot \left(\frac{r}{r+d} \right)^6 \quad (13)$$

Come è intuibile oltre alla radiazione del campo incidente, anche quella derivante dallo scattering Raman delle molecole adsorbite o in prossimità della superficie metallica subiranno un effetto di intensificazione. Poiché le frequenze associate allo scattering Raman sono diverse da quella incidente, esse saranno amplificate in maniera differente rispetto alla linea eccitatrice, ma subiranno allo stesso modo un'intensificazione in quanto c'è solo un piccolo discostamento in frequenza rispetto all'eccitatrice. Da ciò è facile intuire che saranno maggiormente intensificati i modi normali di vibrazione a basso valore di frequenza.

Considerando quindi le linee Stokes, il fattore di intensificazione globale per l'enhancement elettromagnetico, ottenuto utilizzando un laser di frequenza angolare ω_L , può essere visto come:

$$I_{SERS}(\omega_s) = |A(\omega_L)|^2 |A(\omega_s)|^2 \approx \left| \frac{\varepsilon(\omega_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega_L) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \cdot \left| \frac{\varepsilon(\omega_s) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega_s) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \cdot \left(\frac{r}{r+d} \right)^{12} \quad (14)$$

Lo schema del processo di enhancement per una molecola generica adsorbita su una nanoparticella metallica è riportato in figura 10, naturalmente una trattazione del fenomeno perfettamente analoga è possibile per le frequenza anti-Stokes.

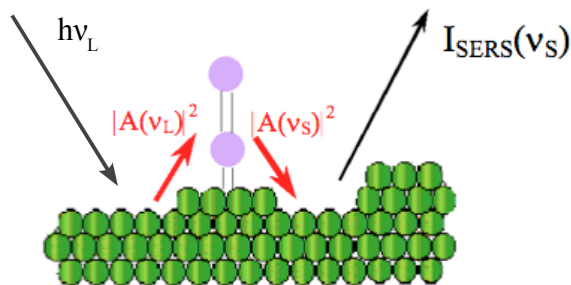


Figura 10. Il fattore di intensificazione della radiazione SERS alla frequenza Stokes $I_{SERS}(\nu_S)$, proporzionale al segnale misurato, è dovuto al prodotto dei fattori di intensificazione del campo, calcolati alla frequenza del laser ν_L e alla frequenza Stokes ν_S della molecola.

Un'analisi di questo tipo permette di giustificare fattori di intensificazione fino a circa 10^6 , tuttavia in letteratura sono presenti articoli che dimostrano l'ottenimento di fattori di intensificazione ben più alti di questo valore e che si spingono addirittura fino alla detezione della singola molecola. Ciò non è solamente dovuto alla presenza dell'altro effetto di intensificazione, quello di tipo chimico, ma al fatto che l'intensificazione del campo elettromagnetico ha una forte dipendenza dalla struttura metallica su cui si origina. In particolare la presenza di zone sulla superficie delle nanoparticelle a carattere frattale permette intensificazioni del campo molto maggiori di quelle usuali ottenibili con

superfici perfettamente regolari. In queste zone l'ulteriore intensificazione non risulta semplicemente la somma di contributi elettromagnetici adiacenti fra loro, ma entrano in gioco effetti di accoppiamento dei dipoli di ordine superiore che si generano durante l'eccitazione.

Oltre infatti alla formazione di dipoli, durante l'interazione con un'onda elettromagnetica si generano anche quadrupoli e multipoli di ordine superiore che giocano un ruolo importante per l'accoppiamento dei campi (figura 11).

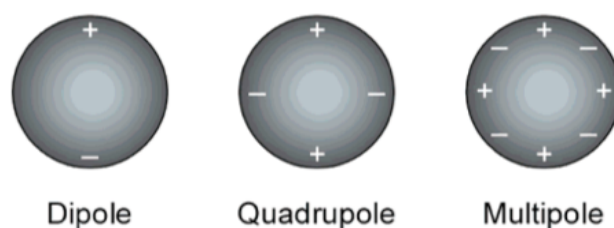


Figura 11. Nonostante la maggiorparte dell'interazione tra particella e onda elettromagnetica si traduca nella formazione di un dipolo, è possibile avere la formazione anche di dipoli di ordine superiore che sono responsabili dell'accoppiamento dei campi nelle zone frattali (hot-spots) delle nanoparticelle.

Le zone frattali su una superficie metallica possono essere schematizzate come hot-spots (punti di intensificazione), di cui ora si vuole dare un'illustrazione.

Per descrivere l'effetto di un hot-spot sull'intensificazione del campo si considera la figura 12(a), dove g è la distanza tra due particelle di argento (raggio $a = 25$ nm) che formano un dimero lungo l'asse z . Il campo della radiazione incidente E_{inc} risulta parallelo all'asse del dimero e oscilla in direzione a essa perpendicolare lungo k .

Dalla 12(b) si nota innanzitutto che la distanza g influisce pesantemente sulle proprietà ottiche, in quanto l'interazione tra i campi generati dalle nanoparticelle produce risonanze plasmoniche differenti da quelle delle particelle singole. Le risonanze dipolari, che sono quelle responsabili dell'effetto SERS, subiscono infatti un red-shift sempre più marcato al diminuire della distanza. Inoltre l'effetto di accoppiamento e di intensificazione è subito anche dai dipoli di ordine superiore a lunghezze d'onda minori. Infatti con l'avvicinarsi delle particelle emerge il loro contributo al coefficiente di estinzione, come mostra ad esempio la risonanza plasmonica calcolata per $g = 1$ nm. Nella figura 12(c) invece si riporta il fattore di enhancement del campo locale SERS (SERS EF), calcolato appena al di fuori della superficie di una delle due sfere lungo l'asse z (ponendo quindi $\theta = 0$). Anche in questo caso, come prevedibile, l'avvicinamento delle particelle si riflette in un progressivo aumento dei fattori di enhancement, i quali possono superare addirittura il fattore 10^{11} . Naturalmente l'accoppiamento dei campi che si instaura è fortemente dipendente dalla posizione

rispetto a cui il campo è misurato: si parla infatti in questo caso di “effetto di localizzazione dell'hot spot”. Ciò è dimostrato dal valore medio $\langle F \rangle$, rappresentato dalla linea tratteggiata, calcolato per $g = 2$, il quale tiene conto di tutti i contributi di accoppiamento per $0^\circ < \theta < 90^\circ$. Dal confronto del fattore di enhancement per $g = 2$ si nota che, mediando i contributi, l'abbassamento complessivo del segnale risulta di due ordini di grandezza.

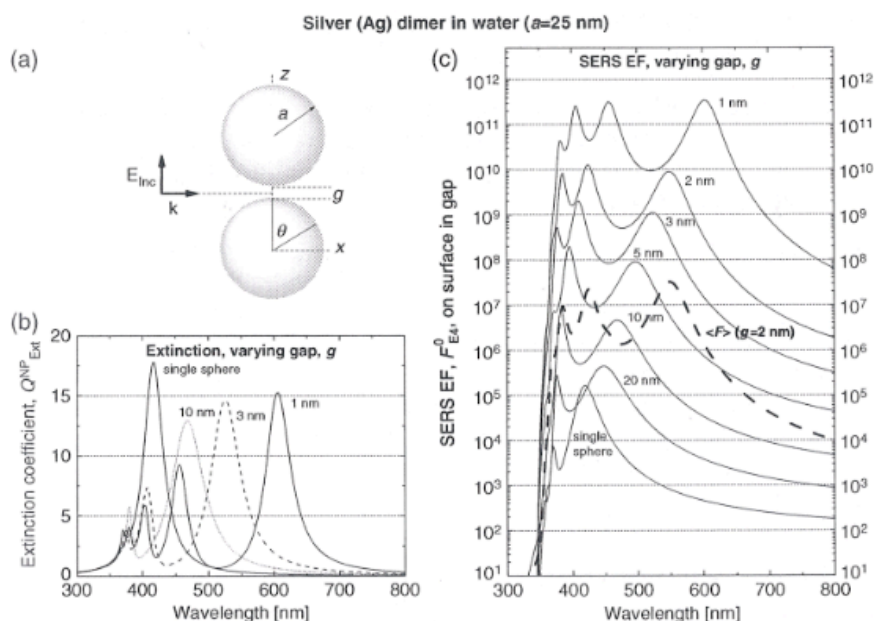


Figura 12. Effetti ottici e di innalzamento del fattore di intensificazione SERS della distanza fra due nanoparticelle di argento in acqua formanti un dimer.

2.6 Enhancement chimico ^[Kneipp (2001)]

Oltre al campo elettrico, responsabile dell'intensificazione elettromagnetica, l'altro parametro che influenza l'intensità del segnale Raman è la polarizzabilità α , come illustrato già nel capitolo 1. Il tensore di polarizzabilità è infatti riconducibile ad un altro meccanismo di intensificazione che dà un contributo proprio all'effetto SERS. Tale meccanismo è dovuto ad un adsorbimento di tipo chimico che si crea tra superficie metallica e analita, in grado di aumentare la sezione d'urto Raman creando nuovi stati elettronici che possono entrare in risonanza con la radiazione incidente. L'interazione che si crea infatti porta ad una parziale sovrapposizione degli orbitali atomici dei due elementi che facilita un trasferimento di carica tra le due specie.

Tale processo di trasferimento è schematizzabile quindi nei seguenti passaggi (figura13): un fotone incidente di energia $h\nu_L$ eccita un elettrone della banda di conduzione del metallo ad un livello eccitato (transizione intra-banda) e proprio a causa dei nuovi livelli elettronici creati dall'interazione con la molecola è possibile per l'elettrone un trasferimento su un livello vibrazionale eccitato di

“Charge Transfer” E_{ct} del complesso. Durante la diseccitazione vibronica l'elettrone compie un percorso inverso tornando al metallo, ma in questo caso si ha anche l'emissione contemporanea di un fotone Raman di energia $h(\nu_L - \nu_{vib})$, in quanto la molecola si porta su un altro livello con una energia differente per un quanto vibrazionale rispetto a quella iniziale.

L'intensificazione chimica è quindi dovuta essenzialmente ad una nuova condizione di risonanza che si crea tra radiazione incidente e il gap $|E_F - E_{CT}|$ creatosi dal complesso del metallo con la molecola.

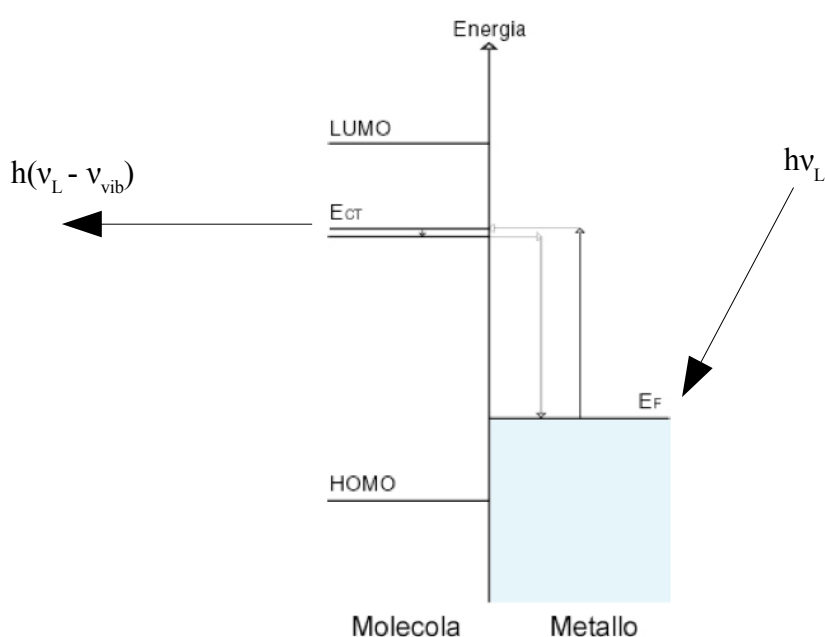


Figura 13. Schematizzazione del complesso a trasferimento di carica responsabile dell'enhancement chimico.

Non deve quindi sorprendere che questo tipo di enhancement sia chiamato anche di “primo strato” in quanto coinvolge esclusivamente le molecole adsorbite sulla superficie metallica. Ciò permette anche di intuire che i siti di adsorbimento e l'orientazione della molecola adsorbita (cioè il tensore di polarizzabilità α) sulla superficie rivestono un ruolo importante nel definire il complesso a trasferimento di carica che si instaura e quindi fattore di intensificazione che si va poi a misurare (il quale comunque difficilmente risulta maggiore di 10^2).

2.7 Enhancement globale [Kneipp (2001)]

A questo punto è possibile definire un fattore di intensificazione globale che tenga conto sia dell'intensificazione elettromagnetica che di quella chimica.

In un'analisi Raman classica il segnale delle linee Stokes $P_{Raman}(\omega_s)$ risulta proporzionale:

- alla sezione d'urto Raman della molecola analizzata σ_{free} [m^2]
- al numero di fotoni forniti dal laser per unità di tempo e di area n_L [$\frac{n^\circ \text{ fotoni laser}}{m^2 s}$]
- al numero di molecole nel volume di scattering N [$n^\circ \text{ molecole}$]

Risulta possibile scrivere quindi: $P_{Raman}(\omega_s) = N \cdot n_L \cdot \sigma_{free}$ [$\frac{n^\circ \text{ fotoni Stokes}}{s}$] (15)

In figura 14 si riporta una schematizzazione di un'analisi Raman, dove il flusso di fotoni n_L inviato arriva sulle N molecole di analita, ognuna con una sezione d'urto Raman σ_{free} .



Figura 14. Le N molecole di analita attraverso la loro sezione d'urto permettono di fornire in uscita un segnale Raman (ω_s) alle frequenze Stokes caratteristiche.

In un esperimento SERS la situazione è concettualmente differente. Oltre a considerare il contributo di intensificazione elettromagnetico illustrato dall'equazione (14), occorre anche modificare la (15) per definire il numero delle molecole di analita adsorbite sulle nanoparticelle e le relative sezioni d'urto, portando a scrivere la seguente espressione:

$$P_{SERS}(\omega_s) = N_{ads} \cdot n_L \cdot \sigma_{ads} \cdot |A(\omega_L)|^2 |A(\omega_s)|^2 \quad \left[\frac{n^\circ \text{ fotoni Stokes}}{s} \right] \quad (16)$$

La situazione sperimentale da analizzare in questo caso è schematizzata in figura 15.

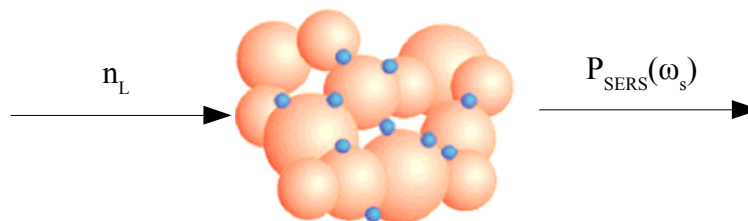


Figura 15. In un esperimento SERS bisogna considerare le molecole di analita effettivamente adsorbite sulle nanoparticelle per ricavare il valore di intensità corrispondente.

Le molecole di analita adsorbite sulle nanoparticelle metalliche e le loro sezioni d'urto sono responsabili dell'intensificazione di tipo chimico: la (16) quindi è in grado di raggruppare entrambi i contributi di enhancement. Va sottolineato inoltre che N_{ads} , dipendendo dall'affinità della molecola con la nanoparticella metallica, può essere anche molto minore di N , e può arrivare ad annullarsi nel caso in cui tra l'analita e la shell elettrostatica della nanoparticella metallica si instaurino forze a forte carattere repulsivo, rendendo così impossibile lo sviluppo del segnale.

2.8 Calcolo dell'enhancement ^[Kneipp (2001)]

Sempre considerando la (16) è possibile definire una sezione d'urto effettiva σ_{eff} dell'effetto SERS:

$$\sigma_{eff} = |A(\omega_L)|^2 |A(\omega_s)|^2 \sigma_{ads} \quad (17)$$

Per valutare ora l'efficacia dell'effetto SERS si definiscono ora, scomponendo la (16), i fattori di intensificazione chimica I_C ed elettromagnetica I_{EM} come:

$$I_C = \frac{\sigma_{ads}}{\sigma_{free}} \quad (18) \quad I_{EM} = |A(\omega_L)|^2 |A(\omega_s)|^2 \quad (19)$$

Da queste espressioni, considerando anche la (17), il fattore di intensificazione totale per effetto SERS è esprimibile attraverso la seguente espressione:

$$I_{Tot} = I_C \cdot I_{EM} = \frac{\sigma_{ads}}{\sigma_{free}} \cdot |A(\omega_L)|^2 |A(\omega_s)|^2 = \frac{\sigma_{eff}}{\sigma_{free}} \quad (20)$$

Il calcolo esatto di I_{Tot} risulta sperimentalmente molto difficile. È comunque possibile con il “metodo del riferimento interno” avere una buona indicazione dell'enhancement del segnale.

Per riferimento interno si intende una molecola presente nel campione studiato di cui si conosce l'inattività SERS e l'intensità assoluta di una sua banda particolare: spesso a questo scopo si utilizza il metanolo. Conoscendo la concentrazione del riferimento e la concentrazione della molecola di cui si vuole conoscere il fattore di intensificazione SERS si calcola, tramite il rapporto tra l'intensità della banda di riferimento e quella della molecola ottenute nello spettro, il fattore di intensificazione totale. I valori che si ottengono con questo metodo di valutazione sono comunque da considerarsi stime per difetto di quelli effettivi di intensificazione, soprattutto per concentrazioni relativamente elevate delle molecole SERS attive, o nei casi in cui l'analita faccia fatica ad adsorbirsi. I valori

ottenuti con questo metodo si avvicinano ai quelli ideali tanto più si è prossimi alle condizioni in cui tutte le molecole hanno trovato un sito SERS-attivo. Sperimentalmente quindi è necessario eseguire uno spettro Raman e uno SERS della sostanza di cui si vuole calcolare il fattore di intensificazione. Dallo spettro Raman si calcola il rapporto tra il segnale di una generica banda A della molecola SERS-attiva rispetto a quello di una banda del riferimento interno, normalizzando il rapporto rispetto alle loro concentrazioni nella soluzione:

$$R_{(Rif, Raman)}^{(A, Raman)} = \frac{P_{Raman}^A c_{Raman}^{Rif}}{P_{Raman}^{Rif} c_{Raman}^A} \quad (21)$$

Per lo spettro SERS si procede in maniera esattamente analoga ottenendo quindi:

$$R_{(Rif, SERS)}^{(A, SERS)} = \frac{P_{SERS}^A c_{SERS}^{Rif}}{P_{SERS}^{Rif} c_{SERS}^A} \quad (22)$$

Il fattore di intensificazione della banda A di una molecola SERS-attiva risulta allora come il rapporto tra la (22) e la (21):

$$F_{Enh}^A = \frac{R_{(Rif, SERS)}^{(A, SERS)}}{R_{(Rif, Raman)}^{(A, Raman)}} \quad (23)$$

2.9 Single molecule spectroscopy ^[Kneipp (2001)]

Uno dei più importanti risultati ottenibili grazie all'effetto SERS è la possibilità di registrare spettri di singola molecola, vale a dire spettri dove è presente una concentrazione così bassa dell'analita da risultare circa uguale (di poco inferiore) ad una molecola per volume di scattering analizzato. In questo caso i fattori di enhancement da raggiungere devono essere dell'ordine di 10^{14} . Questi valori sono dati da un attento controllo dei parametri, al fine di massimizzare da una parte l'interazione fra analita e particella e dall'altra la risonanza fra la frequenza del laser utilizzato e i plasmoni delle nanoparticelle. L'esempio di studio fatto su questo argomento che si è deciso di riportare ora è quello effettuato da Kneipp (2001), nel quale sono state effettuate detezioni a livello di singola molecola del Crystal Violet.

Registrando una serie di 100 spettri SERS successivi, con tempi di acquisizione di un secondo ciascuno su una soluzione colloidale di argento con una concentrazione 0,6 molecole di Crystal

Violet nei 30 pl del volume di scattering, è possibile osservare le tipiche fluttuazioni del segnale, riportate in figura 16.

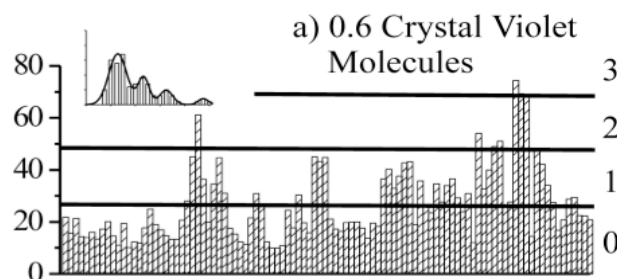


Figura 16. Intensità Raman registrate per la banda a 1174 cm^{-1} del Crystal Violet in funzione del numero di spettri registrati (100), con una concentrazione di 0,6 molecole nei 30 pl del volume di scattering.

Queste fluttuazioni indicano il numero di molecole analizzate per un particolare spettro registrato, dimostrando che il volume di scattering vede nel tempo una variazione del numero di molecole di Crystal Violet al suo interno. Occorre sottolineare che le condizioni operative adottate per eseguire quest'analisi hanno previsto un'aggregazione delle particelle tramite un agente flocculante, al fine di ottenere una struttura frattalica del cluster formatosi in grado di fornire gli elevatissimi enhancement necessari ad una detezione di questo tipo.

Riportando l'intensità della banda (normalizzata rispetto al valore più elevato) in funzione del numero di occorrenze si osserva un andamento che segue la statistica di Poisson (figura 17).

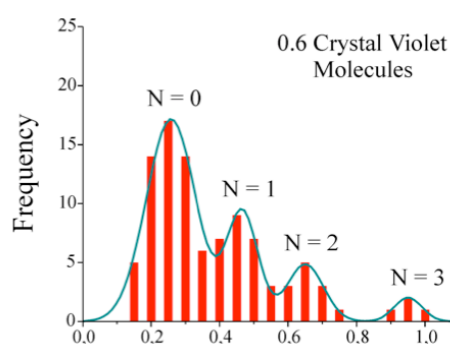


Figura 17. Numero di occorrenze in funzione dell'intensità normalizzata per la banda a 1174 cm^{-1} .

La detezione della singola molecola permette di comprendere un'altra caratteristica peculiare dell'effetto SERS, che è quella della fluttuazione del segnale della molecola. Le variazioni dell'intensità del segnale sono dovute, come detto, al fatto che sono presenti un numero diverso di molecole analizzate. Ciò è dovuto al fatto che nell'hot-spot della zona frattale all'interno del volume di scattering analizzato il moto delle particelle è di tipo browniano: tale moto porta le molecole di

analita ad entrare e a uscire continuamente dal volume di analisi, come schematizzato in figura 18.

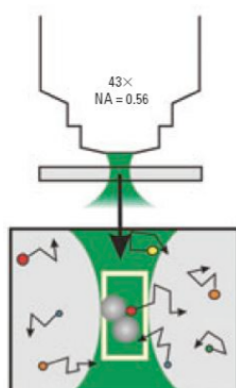


Figura 18. Il moto browniano delle molecole all'interno della soluzione porta le stesse ad entrare e uscire in maniera continua dalle zone frattali dell'aggregato posto all'interno del volume di scattering, evidenziato in verde.

Registrando invece degli spettri di una banda del metanolo con una concentrazione di molecole all'interno del volume di scattering enormemente maggiore (10^{14}), si osserva una drastica diminuzione del numero di fluttuazioni e una distribuzione delle occorrenze che segue in questo caso un profilo gaussiano (figura 19).

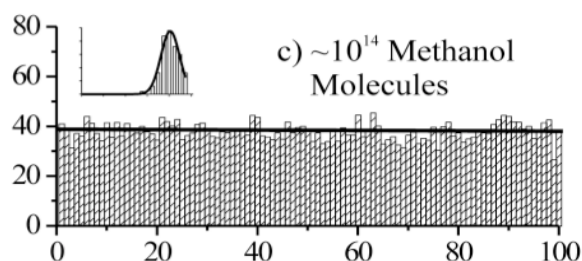


Figura 19. Intensità Raman registrate per una banda del metanolo in funzione del numero di spettri registrati (100), con una concentrazione di 10^{14} molecole nei 30 pl del volume di scattering. La mancanza di fluttuazioni del segnale Raman è dovuta ad un numero troppo alto di molecole nel volume di scattering che si riflette in una distribuzione delle occorrenze di tipo gaussiano, come mostrato in alto a sinistra.

Capitolo III

Strumentazione utilizzata

Di seguito vengono mostrate sinteticamente le strumentazioni usate durante il lavoro di tesi per registrare spettri Raman e di assorbimento UV-VIS.

3.1 Raman dispersivo LabRAM HR800

Questo spettrometro dispersivo è prodotto dalla Horiba Jobin Yvon ed è accoppiato per le misure in modalità micro ad un microscopio Olympus BX41 (figura 1).



Figura 1. Raman dispersivo LabRAM HR800 in modalità micro con microscopio Olympus BX41 e stage per misure di mapping.

Lo schema dell'intero apparato utilizzato per ottenere spettri Raman è riportato in figura 2. Dalla figura si nota che il detettore CCD, il suo power supply, quelli dello spettrometro e dello stage XY sono alloggiati all'esterno. Allo stesso modo anche la strumentazione di controllo dei laser trova posto al di fuori dello strumento. In figura 2 si evidenzia anche la presenza dello stage XY necessario per le misure di mapping e il joystick per il posizionamento XYZ del campione. Completano l'apparecchiatura la presenza di una lampada a luce bianca e del suo generatore di potenza necessari per mettere a fuoco il campione prima della misura. Il tutto è naturalmente

collegato al PC dotato del software Labspec per la gestione degli spettri e dei parametri operativi.

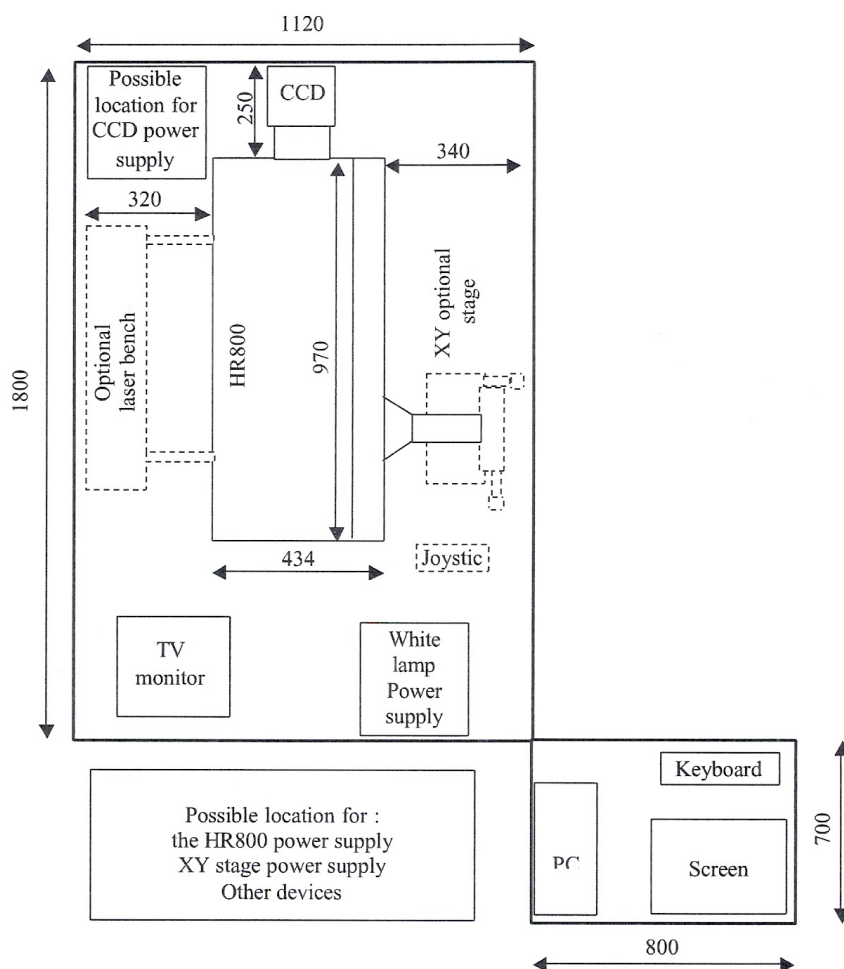


Figura 2. Elementi principali dello spettrometro dispersivo LabRAM HR800, le quote sono riportate in mm.

Le parti più importanti che compongono lo strumento sono quindi le seguenti:

- LASER
- MICROSCOPIO
- SPETTROMETRO
- RILEVATORE CCD
- ELETTRONICA DI CONTROLLO

Dopo aver scelto la lunghezza d'onda del laser da impiegare il fascio viene diretto all'interno dello strumento mediante un sistema di ottiche che, tramite un filtro interferenziale, elimina le linee spurie di emissione del laser stesso (linee di plasma). A questo punto la potenza del fascio è regolata

mediante una serie di filtri a differente densità ottica. Successivamente il laser colpisce il filtro notch e viene riflesso verso il campione posto sotto l'obiettivo del microscopio.

Dall'interazione tra onda e campione ha luogo l'effetto Raman in cui la radiazione diffusa in backscattering si dirige ancora verso il filtro notch: tale filtro elimina la componente di Rayleigh lasciando passare le componenti Stokes e le anti-Stokes che vengono disperse dal reticolo e inviate al CCD per essere acquisite ed elaborate, ottenendo sullo schermo lo spettro Raman del campione.

Caratteristiche tecniche principali del Raman dispersivo LabRAM HR800

Laser: nella tabella 1 si riportano i laser disponibili sullo strumento e le loro lunghezze d'onda caratteristiche.

Laser	Linea eccitatrice caratteristica
HeCd	325 nm
Ar ⁺	458 nm e 514 nm
HeNe	633 nm
Diodo laser	785 nm

Tabella 1. Laser disponibili sullo spettrometro Raman dispersivo LabRAM HR800.

Microscopio: in modalità micro sullo strumento è montato un microscopio ottico Olympus BX41 con i seguenti obiettivi e aperture numeriche NA corrispondenti:

- 4X NA = 0,13
- 10X NA = 0,25
- 20X NA = 0,5
- 50X NA = 0,7
- 100X NA = 0,9

Il microscopio è collegato ad una telecamera a colori che permette di osservare sullo schermo l'immagine del campione e della zona illuminata dal laser, è previsto inoltre un alloggiamento apposito per analisi con fibre ottiche. Una lampada a luce bianca collegata al microscopio fornisce la luce necessaria per illuminare la zona di campionamento e metterla a fuoco.

Spettrometro: lo spettrometro adotta una configurazione del monocromatore Czerny-Turner asimmetrica, ed ha una lunghezza focale di 800 mm. Questa configurazione, non avendo ottiche rifrattive permette di avere un ampio intervallo di frequenza di utilizzo, da 300 a 1064 nm.

Il principio di funzionamento del monocromatore è riportato in figura 3. La luce bianca entrante è focalizzata da una fenditura di ingresso ed è inviata ad uno specchio concavo che collima il fascio indirizzandolo al reticolo di diffrazione in grado di ruotare. La radiazione, scomposta nelle sue lunghezze d'onda in quanto focalizzata in punti differenti, viene reindirizzata ad un altro specchio concavo (focusing mirror) che a sua volta la invia al reticolo del dettore CCD. Ogni lunghezza d'onda è focalizzata in una posizione differente in funzione dell'angolo di rotazione del reticolo.

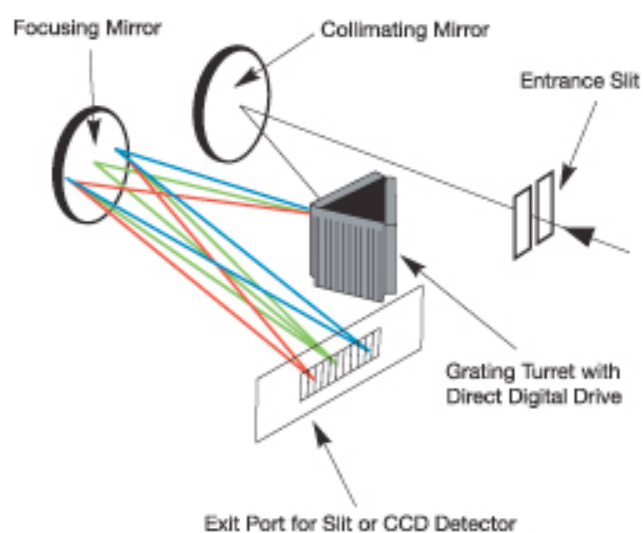


Figura 3. Monocromatore Czerny-Turner asimmetrico.

I reticoli di diffrazione disponibili sono: 600, 1800 e 2400 linee/mm, ottimizzati per le sorgenti laser a disposizione. Per quanto riguarda invece l'ottica dello spettrometro, essa è costituita principalmente da specchi per indirizzare il fascio, dal filtro notch, e da filtri neutri a diverse densità ottiche D che attenuano la potenza iniziale del laser P_0 , facendolo arrivare sul campione con una potenza effettiva P . La densità ottica D è data dall'equazione:

$$D = \log(I_0/I)$$

dove I è l'intensità del campo elettrico uscente e I_0 quella incidente sul filtro. I valori di densità ottica dei filtri e i corrispondenti di potenza sono riportati in tabella 2.

D	Attenuazione Potenza
0	$P = P_0$
0,3	$P = P_0/2$
0,6	$P = P_0/4$
1	$P = P_0/10$
2	$P = P_0/100$
3	$P = P_0/1000$
4	$P = P_0/10000$

Tabella 2. Per valori crescenti della densità ottica dei filtri **D**, a pari valore della potenza iniziale del laser **P₀**, diminuisce la potenza effettiva **P** incidente sul campione.

Detettore: il detettore dello spettrometro è un CCD di 1024x256 pixel che opera a -70 °C tramite raffreddamento con cella Peltier. Il CCD (Charged Coupled Device) accumula carica elettrica in maniera proporzionale all'intensità dei raggi luminosi che lo investono. Ogni radiazione di una certa lunghezza d'onda diffusa dal campione andrà a colpire il CCD in punti diversi, ognuno con la propria intensità, fornendo in questo modo lo spettro del campione.

Elettronica di controllo: la parte hardware permette il controllo delle fenditure, dei reticoli, dello shutter di ingresso del laser e del rilevatore, oltre che dell'alimentazione della telecamera e dei sistemi di allineamento. La parte software è costituita dal programma Labspec che permette la definizione di vari parametri di acquisizione (modo di acquisizione, range spettrale, tempo e numero delle acquisizioni).

3.2 FT-Raman Nicolet NXR 9650

Lo strumento, prodotto dalla Thermo Instruments, è riportato in figura 4.



Figura 4. FT-Raman Nicolet NXR 9650.

Lo spettrometro funziona a trasformata di Fourier (FT) e utilizza un laser nel NIR (NdYVO_4 a 1064 nm) per limitare i problemi di fluorescenza tipici del Raman dispersivo con laser nel visibile. Quando il laser colpisce il campione la luce diffusa viene raccolta in backscattering e focalizzata da uno specchio ricoperto con un coating di oro. Il fascio, filtrato da un filtro notch, è inviato all'interferometro di Michelson. I sensori disponibili sono un rivelatore CCD InGaAs raffreddato con una cella Peltier, e un rivelatore al Ge raffreddato ad azoto liquido.

In figura 5 viene riportata una visione schematica dall'alto dello strumento.

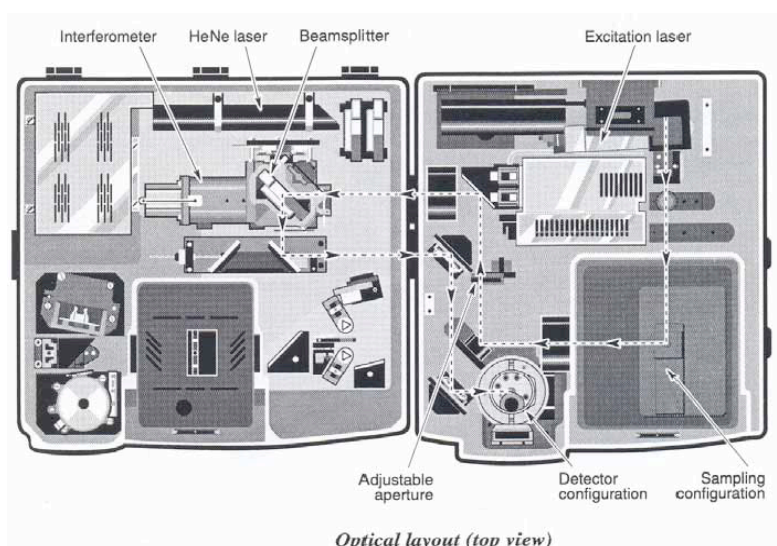


Figura 5. Vista dall'alto dello spettrometro FT-Raman Nicolet NXR 9650. Le frecce indicano il percorso della radiazione luminosa che, dopo l'interazione con il campione, passa attraverso il filtro notch per essere inviata poi al beam-splitter dell'interferometro. La radiazione è quindi analizzata tramite il dettore. Da notare la possibilità di effettuare misura in luce polarizzata tramite un polarizzatore.

Le componenti principali che possono essere individuate sono le seguenti:

- SORGENTE (laser NdYVO₄ con $\lambda = 1064$ nm)
- VANO PORTA CAMPIONI
- INTERFEROMETRO DI MICHELSON
- RILEVATORI (InGaAs, Ge)
- ELETTRONICA DI CONTROLLO

La differenza tra questo spettrometro e uno dispersivo sta nell'utilizzo dell'interferometro di Michelson a trasformata di Fourier. Negli FT-Raman infatti l'interferometro è dotato di uno specchio mobile che si muove a velocità costante durante l'acquisizione. Il segnale registrato dal rilevatore al variare della posizione dello specchio mobile (interferogramma) è convertito in uno spettro nel dominio delle frequenze spaziali (numeri d'onda, cm^{-1}) tramite la trasformata di Fourier. Il controllo delle frequenze è affidato all'interferenza del segnale di un laser He-Ne: ciò permette un'elevata precisione e ripetibilità delle misure. Questi spettrometri inoltre consentono di acquisire l'intero spettro nel range spettrale desiderato simultaneamente, fornendo inoltre la possibilità di utilizzare l'intera potenza radiante della sorgente.

Caratteristiche tecniche principali dell'FT-Raman Nicolet NXR 9650

Intervallo spettrale: $-3000 \div 4000 \text{ cm}^{-1}$ (Raman Shift)

Sorgente: laser Nd-YAG, $\lambda = 1064$ nm, potenza massima operativa 2 W

Rilevatore: CCD InGaAs raffreddato termoelettricamente

Interferometro: tipo Michelson

Beam-splitter interferometro: silicio su CaF₂ ottimizzato per NIR

Risoluzione: $1 \div 32 \text{ cm}^{-1}$

3.3 Spettrofotometro UV-VIS JASCO V-570

Lo spettrometro utilizzato per effettuare misure di assorbimento sui colloidi è riportato in figura 6.



Figura 6. Spettrometro UV-VIS della JASCO V-570: tale spettrometro fornito di lampada alogena come sorgente permette di coprire anche il range del NIR.

Lo schema di funzionamento dello strumento è riportato in figura 7. Le lampade al deuterio D_2 e alogena WI servono per coprire l'intero range spettrale su cui effettuare la misura, emettendo radiazione rispettivamente nell'UV e nel VIS-NIR. Uno specchio sferico M1 seleziona la sorgente che illumina la fenditura di ingresso del monocromatore indirizzando la radiazione verso lo specchio piano M2 che la invia a sua volta sulla torretta filtri F. Le fenditure S_1 e S_2 sono variabili in larghezza ed altezza mediante un disco rotante, mentre il monocromatore di tipo Czerny-Turner utilizza due reticoli disperdenti G_1 e G_2 con cambio programmabile tra 800 e 900 nm per coprire tutto il campo spettrale.

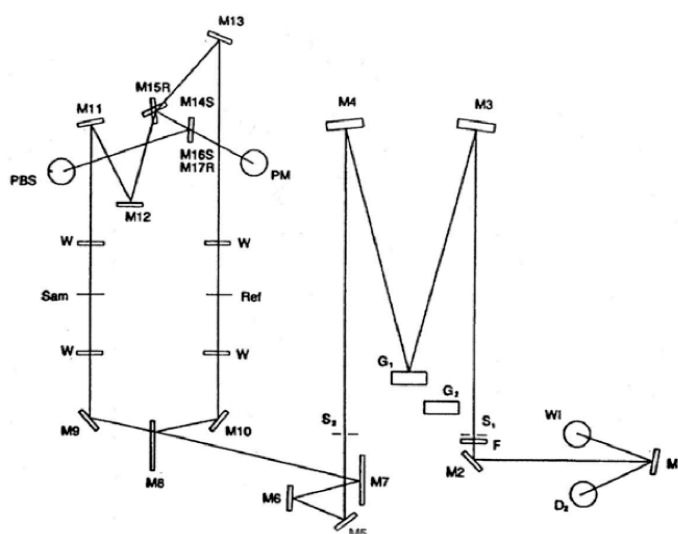


Figura 7. Schema di funzionamento dello spettrometro JASCO V-570.

Dopo che la radiazione è stata dispersa viene riflessa tramite ottiche (da M4 fino a M7) per arrivare ad uno specchio semiriflettente M8 che la separa in due componenti che andranno sul campione (Sam) e sul riferimento (Ref). A questo punto l'ottica di raccolta a specchi (da M11 a M17) è in grado di presentare l'immagine dei due raggi sulla stessa superficie del rivelatore selezionato, che può essere un fotomoltiplicatore per UV e VIS o PbS per il NIR. Da ciò consegue che un singolo rivelatore vede alternativamente il segnale del campione, del riferimento e del buio che poi viene sottratto. I due segnali analogici relativi a campione e riferimento vengono trattati per fornire l'informazione nella scala di riferimento prescelta (assorbanza, %T, %R,...).

Attraverso il software Spectra Manager è possibile ovviamente controllare i parametri operativi dello spettrometro e gestire gli spettri acquisiti. Per i colloidi analizzati sono state effettuate sempre misure di assorbimento tramite cuvette di quarzo dallo spessore di 1 cm (figura 8), mentre come riferimento si è utilizzata sempre acqua deionizzata.

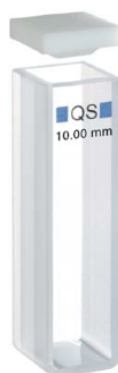


Figura 8. Cuvetta in quarzo dallo spessore di 1 cm utilizzata per le misure di assorbimento dei colloidi.

Si ricorda che il fenomeno dell'assorbimento, schematizzato in figura 9, segue la nota legge di Lambert-Beer secondo la quale l'assorbanza A ha una dipendenza dalla intensità della radiazione incidente I_0 e trasmessa I di tipo logaritmico.

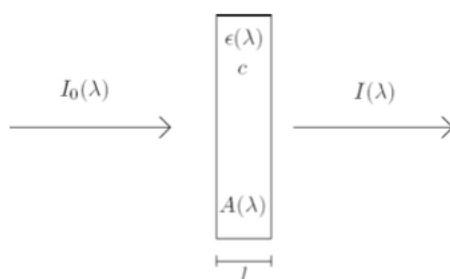


Figura 9. L'intensità della radiazione incidente I_0 e trasmessa I è funzione della concentrazione c , dello spessore attraversato l e del coefficiente di estinzione molare ϵ della specie. Da notare la dipendenza dei parametri dalla lunghezza d'onda λ .

In particolare l'assorbanza A risulta in questo modo proporzionale ad un coefficiente di estinzione molare ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$), alla larghezza della cuvetta l e alla concentrazione c (M), secondo la relazione:

$$A = \log(I_0/I) = c \cdot l \cdot \epsilon$$

Caratteristiche tecniche principali dello spettrometro JASCO V-570 UV-VIS-(NIR)

Intervallo spettrale: 190 ÷ 2500 nm

Risoluzione: 0,1 ÷ 10 nm per UV-VIS; 0,4 ÷ 40 nm per NIR

Luce diffusa: 0,03% a 220 nm

Velocità di scansione: 10 ÷ 4000 nm/min

Monocromatore: due tipo Czerny-Turner; 1200 linee/mm per UV-VIS e 300 linee/mm per NIR

Rivelatore: fotomoltiplicatore per UV-VIS e PbS raffreddato ad effetto Peltier per NIR

Capitolo IV

Colloidi

4.1 Lo stato colloidale [Enc. Scientifica Tecnica Garzanti, Shaw (1992)]

Lo stato colloidale è un particolare stato della materia intermedio tra quello di soluzione omogenea e quello di dispersione eterogenea. Questo stato "nanoeterogeneo" consiste di due fasi in cui una sostanza risulta finemente dispersa in un'altra che costituisce la fase continua.

A seconda dello stato fisico della fase dispersa e della fase continua si possono distinguere numerosi sistemi, che vengono riportati in tabella 1.

Fase dispersa	Fase continua	Definizione	Esempio
Liquido	Gas	Aerosol liquido	Nebbia, spray liquidi
Solido	Gas	Aerosol solido	Fumo, particolato, polvere
Gas	Liquido	Schiuma	Schiuma da barba
Liquido	Liquido	Emulsione	Latte, maionese, sangue
Solido	Liquido	Sol	Soluzioni colloidali
Gas	Solido	Schiuma solida	Polistirene espanso
Liquido	Solido	Gel	Formaggio
Solido	Solido	Sospensione solida	Leghe metalliche

Tabella 1. Principali categorie di sistemi colloidali.

Considerando ora i sistemi dove una fase solida è dispersa in una liquida, vale a dire le soluzioni colloidali (sols), e prendendo come parametro di riferimento il diametro d delle particelle solide disperse, una suddivisione di massima tra soluzioni omogenee, colloidali ed eterogenee può essere schematizzata come mostrato in tabella 2.

$d < 1 \text{ nm}$	$1 \text{ nm} < d < 1 \text{ }\mu\text{m}$	$d > 1 \text{ }\mu\text{m}$
Soluzione omogenea	Soluzione colloidale	Soluzione eterogenea

Tabella 2. Suddivisione degli stati fisici in soluzione in funzione del diametro d delle particelle disperse.

Mentre le soluzioni omogenee consistono di molecole di soluto libere di muoversi le une rispetto alle altre e sono sempre limpide, le soluzioni colloidali si presentano invece generalmente torbide (è possibile tuttavia avere dei colloidali limpidi) e a differenza delle prime non sottostanno alle note leggi dell'ebullioscopia e delle crioscopia. D'altra parte esse si differenziano dalle dispersioni eterogenee per le dimensioni molto minori della fase dispersa, che risulta in questo modo impercettibile ad occhio nudo.

La presenza di nanoparticelle nelle sospensioni colloidali causa diffusione della luce. Per questo motivo un raggio luminoso che attraversa un sistema colloidale è ben visibile ad occhio nudo, cosa che invece non avviene in una soluzione omogenea, in quanto le dimensioni delle molecole o degli ioni disciolti non sono sufficienti per disperdere efficientemente la luce (figura 1).



Figura 1. Nella figura sono mostrati due bicchieri: quello a destra contiene acqua deionizzata pura, mentre quello a sinistra è costituito da una dispersione colloidale di nanoparticelle di argento molto diluita in soluzione acquosa. Utilizzando un puntatore laser si nota che il colloide è in grado di disperdere la luce rendendo in questo modo visibile il fascio. Ciò è dovuto al fatto che le nanoparticelle di argento, a differenza delle molecole di acqua, hanno una dimensione tale da produrre lo scattering del fascio laser.

Altre caratteristiche delle soluzioni colloidali sono il moto browniano delle particelle della fase dispersa, dovuto alle continue collisioni con le molecole circostanti del mezzo disperdente, e il fatto che le particelle disperse per le loro dimensioni non sono in grado di attraversare membrane, come invece avviene per le soluzioni omogenee. E' possibile a questo punto suddividere ulteriormente le soluzioni colloidali in funzione delle interazioni che si creano tra fase disperdente e fase dispersa in colloidali liofili e colloidali liofobi.

I colloidali liofili sono caratterizzati da elevata affinità tra fase dispersa e fase disperdente, per cui questi sistemi colloidali possono considerarsi in teoria come omogenei. Messi in soluzione si rivestono di uno strato di molecole di solvente (solvatazione) e diventano così pseudo-solubili,

ovvero sembrano solubili. Esempi di colloidali liofili sono rappresentati dalle soluzioni di molti polimeri naturali (es. gomma, amido) o sintetici (nylon, polietilene), e da quelle dei saponi e detergenti sintetici.

I colloidali liofobi invece sono sistemi colloidali caratterizzati da scarsa affinità tra la fase dispersa e quella disperdente, per cui risultano instabili e tendono a dar luogo ad una separazione di fase nel tempo. Esempi di colloidali liofobi sono rappresentati dalle soluzioni colloidali di elementi quali oro, argento, rame, platino, palladio, alogenuri di argento ed idrossidi di ferro o alluminio. Sono quindi di natura inorganica e risultano stabili per un dato periodo di tempo per cause di origine elettrostatica.

Nel corso di questo lavoro di tesi sono state analizzate soluzioni colloidali di nanoparticelle di argento e oro in soluzione acquosa, che rientrano quindi nella categoria dei colloidali liofobi. Risulta quindi opportuno analizzare in dettaglio le caratteristiche chimico-fisiche di queste soluzioni colloidali al fine di comprendere la natura della loro stabilità.

4.2 Nanoparticelle metalliche [Klabunde (2001), Lucotti (2005), Pesapane (2005), Shaw (1992)]

4.2.1 Introduzione

L'impiego delle nanoparticelle metalliche, in particolare di oro, come coloranti per i vetri delle cattedrali antiche era già noto ai tempi dei romani. In questo modo si potevano ottenere vetrate con delle colorazioni molto intense e una ridotta percentuale di luce diffusa (figura 2).



Figura 2. Vetrata della Cattedrale del Duomo di Milano raffigurante la nascita di Sant'Eligio, patrono degli orafi, realizzata da Niccolò da Varallo (1480-1486). Il colore rosso è dovuto all'oro colloidale disperso nel vetro.

Nel corso dei secoli i metodi di preparazione per ottenere colloidali e quindi vetrate di vari colori e sfumature sono andati sempre più affinandosi (figura 2), tuttavia tali metodi sono stati tramandati tra gli artigiani solo per via orale al fine di mantenerne la segretezza. Occorre attendere fino al 1675 per avere le prime notizie attendibili circa le ricette impiegate. Andreas Cassius e Johan Knuckel in quell'anno descrissero come una miscela in soluzione di diossido di stagno e oro fosse in grado di produrre un intenso colore porpora, detto “porpora di Cassio”, utilizzato per colorare oltre che vetri anche indumenti. La preparazione prevedeva la riduzione di sali di oro attraverso Sn(II) derivante dall'ossido, in modo da ottenere piccolissime particelle di oro che erano in grado di dare questo colore caratteristico molto intenso. Tuttavia la reale presa di coscienza del fatto che il colore porpora dipendesse dall'oro e dalle sue dimensioni si ebbe solo nel 1802 con Richter, e soltanto nel 1834 con Faraday ci fu il primo studio “scientifico” sulle colorazioni dei colloidali di oro. Egli infatti dimostrò definitivamente, preparando delle soluzioni che andavano dal rosso al blu, che il colore dei colloidali era dovuto alle loro dimensioni delle nanoparticelle in esso disperse e non ad un particolare stato di ossidazione del metallo.

Progredendo nel tempo, una pietra miliare nello sviluppo della scienza delle particelle metalliche furono le considerazioni di Mie sul colore dei colloidali metallici (1908). Egli infatti fu in grado di giustificare quantitativamente i colori delle nanoparticelle risolvendo il problema dello scattering e dell'assorbimento della luce da parte di piccole sfere metalliche, mettendo in relazione la funzione dielettrica al picco dello spettro di assorbimento.

Arrivando al giorno d'oggi l'introduzione delle microscopie TEM (Transmission Electron Microscopy), AFM (Atomic Force Microscopy) e STM (Scanning Tunneling Microscopy) ha permesso di sfiorare la risoluzione atomica dando un forte impulso alla ricerca sulle nanoparticelle metalliche. La possibilità di analizzare con grande precisione questi sistemi ha inoltre evidenziato i limiti delle interpretazioni teoriche date in passato, e ha permesso lo sviluppo di modelli sempre più completi e sofisticati in grado di descrivere correttamente le proprietà osservate.

4.2.2 Il doppio strato elettrico

Rimandando ai paragrafi successivi la trattazione dettagliata dei metodi di sintesi dei colloidali di argento e oro e delle loro caratteristiche di assorbimento plasmonico, si analizzeranno ora in dettaglio le proprietà fisiche di tali colloidali introducendo il concetto di “doppio strato elettrico”, comune a tutti i colloidali ottenuti tramite riduzione chimica.

Le particelle colloidali in sospensione presentano infatti un'interfaccia carica chiamata “doppio strato elettrico”, fondamentale per la loro stabilità in soluzione. Tale interfaccia si forma durante il processo di sintesi delle nanoparticelle ed è dovuta all'interazione fra la superficie metallica della

nanoparticella e l'agente riducente utilizzato, di cui si riporta una rappresentazione in figura 3.

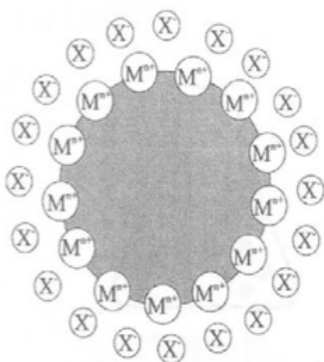


Figura 3. Nanoparticella metallica in soluzione: in evidenza l'interazione elettrostatica fra il metallo M^{n+} e l'agente riducente utilizzato durante la sintesi X^{-} .

Analizzando in dettaglio la distribuzione della carica sulla superficie è possibile schematizzarla in modo tale da definire uno strato di ioni adsorbiti sulla superficie (Stern layer), formanti un legame elettrostatico con i cationi metallici, e uno strato diffuso (diffuse layer), nel quale gli ioni sono distribuiti secondo l'influenza delle forze elettriche e il moto termico della soluzione.

4.2.3 La parte interna del doppio strato (Stern layer)

Nel 1924 Stern propose un modello nel quale il doppio strato risulta diviso in due parti separate da un piano (il piano di Stern), posizionato ad una distanza pari al raggio dello ione idrato dalla superficie, assumendo quindi la possibilità di avere uno specifico adsorbimento ionico.

Ioni adsorbiti in maniera specifica sono quelli che hanno un'interazione elettrostatica sufficientemente elevata tale da superare l'agitazione termica e i loro centri sono posizionati a cavallo dello Stern plane. A causa dell'eccesso di carica non controbilanciato presente alla superficie si formerà quindi un potenziale, indicato con ψ , il cui valore sarà decrescente all'aumentare della distanza con la superficie della nanoparticella. In particolare si possono assumere ψ_0 e ψ_d i valori del potenziale sulla superficie e sullo Stern plane rispettivamente, come riportato in figura 4.

Il valore ψ_0 è proporzionale alla densità di carica superficiale della nanoparticella e alla composizione ionica del mezzo, e può essere stimato sia in maniera teorica che sperimentale per ogni soluzione colloidale, mentre il valore di ψ_d è misurabile tramite microelettroforesi.

Analizzando la figura 4 è possibile vedere come il potenziale nel primo tratto decresca con la distanza ad una velocità maggiore rispetto a quello dello strato diffusivo, giustificando la necessità di compiere trattazioni diverse per rappresentare i due strati e quindi anche, implicitamente, la natura diversa che li caratterizza.

4.2.4 La parte esterna del doppio strato (strato diffusivo)

La trattazione più semplice dello strato diffusivo è stata compiuta da Gouy e Chapman agli inizi del '900 e si basa sulle seguenti assunzioni fondamentali:

- la superficie della nanoparticella è assunta planare e uniformemente carica
- gli ioni della parte diffusiva sono approssimabili come cariche puntiformi distribuiti secondo la statistica di Boltzmann
- il solvente influenza il doppio strato solo attraverso la sua costante dielettrica
- si assume la presenza di un singolo elettrolita simmetrico

Sulla base di queste assunzioni è stata sviluppata una trattazione approfondita che fornisce come risultato un andamento del potenziale nello strato diffusivo del tipo:

$$\psi = \psi_d \cdot \left[\frac{(r + \delta)}{x} \right] \cdot \exp[-\kappa(x - (r + \delta))] \quad \text{dove } x \geq r + \delta$$

dove r è il raggio della particella, δ lo spessore dello Stern layer, x la variabile che misura la distanza dal centro della particella, mentre $1/\kappa$ è un parametro che quantifica l'estensione dello strato diffusivo.

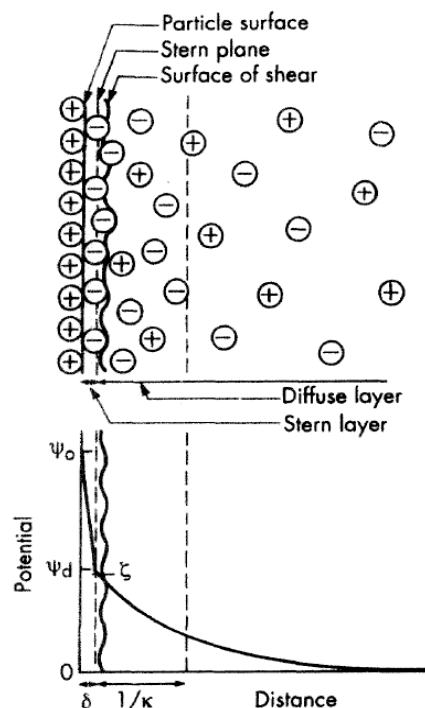


Figura 4. Andamento del potenziale in funzione della distanza dalla nanoparticella metallica: da notare il cambiamento di pendenza a cavallo del piano di Stern.

Sfortunatamente, nel caso in cui non vengano rispettate tutte le ipotesi su cui la trattazione si basa, non è possibile utilizzare un'equazione di questo tipo per definire il potenziale nella zona diffusa. In tal caso si è costretti a rinunciare ad integrazioni analitiche dell'equazione di distribuzione di carica per un'interfaccia sferica e a ricorrere a complesse integrazioni numeriche.

4.2.5 Stabilità dei colloidi

Una delle caratteristiche più peculiari dei colloidi metallici è la stabilità che dimostrano nel corso del tempo all'interno delle soluzioni acquose nelle quali sono stati sintetizzati. Ciò è dovuto, come mostrato nei paragrafi precedenti, alla formazione di un doppio strato carico che dà luogo ad un bilanciamento delle forze in gioco: da una parte quelle attrattive di Van der Waals che hanno un andamento proporzionale a r^{-7} * e dall'altra quelle elettrostatiche repulsive, le quali presentano invece un andamento decrescente secondo una legge esponenziale (cfr. paragrafo 4.2.4). Di conseguenza le forze attrattive saranno predominanti a piccole e grandi distanze, mentre a distanze intermedie prevarrà il contributo repulsivo.

Considerando due particelle vicine in soluzione la sovrapposizione di questi due contributi produce quindi un potenziale di interazione netto, della forma di quello riportato in figura 5.

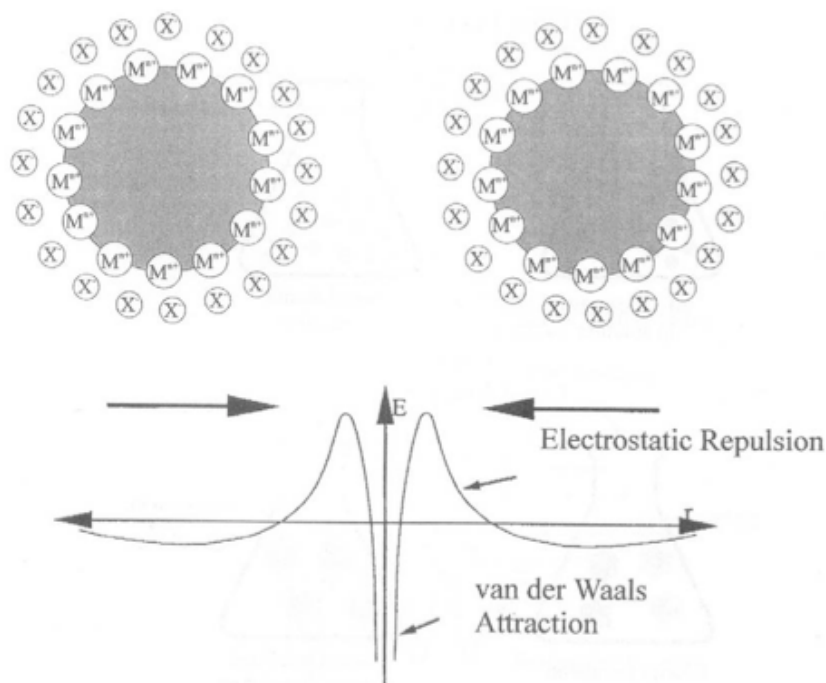


Figura 5. Andamento del potenziale di interazione fra due particelle in soluzione. La distanza di equilibrio è il valore di r tale per cui la $dE/dr = 0$. Per $(dE/dr) < 0$ si ha repulsione, mentre per $(dE/dr) > 0$ si ha attrazione.

* Si ricorda che per la parte attrattiva del potenziale di Lennard-Jones vale la seguente relazione di proporzionalità:
 $V_{vdw} \propto (1/r^6)$

L'altezza del massimo nella curva di potenziale è un indice della sua stabilità del colloide: all'aumentare del massimo aumenta la barriera da superare per promuovere l'aggregazione delle due particelle, facendo prevalere in questo modo le forze attrattive su quelle repulsive. Questo fenomeno è ben descritto della figura 6 dove si riportano due diversi contributi repulsivi $V_R(1)$ e $V_R(2)$ che formano altrettanti potenziali di interazione netti $V(1)$ e $V(2)$, quando sommati al contributo attrattivo V_A . Nel caso della curva $V(2)$ la repulsione del doppio strato non è sufficiente per evitare la coagulazione delle particelle, in quanto la curva, diversamente dalla $V(1)$, giace sempre nel quadrante sottostante che definisce l'interazione attrattiva.

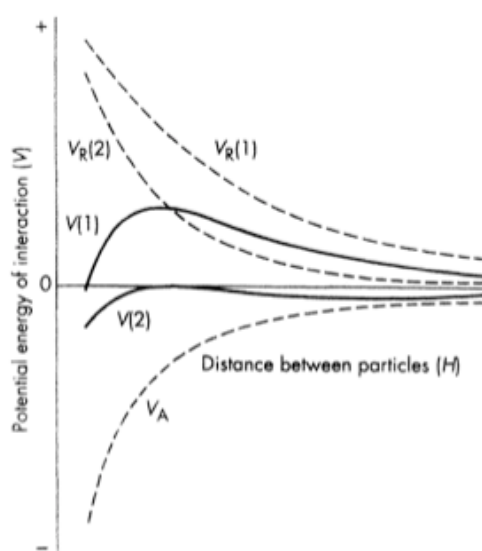


Figura 6. $V(1)$ e $V(2)$, derivando da due differenti potenziali repulsivi sommati al potenziale attrattivo comune V_A , danno luogo a due andamenti diversi dei potenziali netti, il secondo dei quali non è in grado di stabilizzare il colloide.

Per avere ora una stima seppure approssimata della stabilità del colloide è possibile confrontare il massimo del potenziale con l'energia termica media delle particelle (kT). Se tale valore infatti è maggiore rispetto all'energia termica delle particelle allora il sistema sarà stabile, altrimenti il colloide tenderà a coagulare non appena il potenziale diventerà minore dell'energia termica, a causa ad esempio dell'aggiunta di un generico agente flocculante.

In buona approssimazione quindi l'altezza della barriera di energia potenziale che ostacola la coagulazione risulta proporzionale al valore di ψ_d e allo spessore dello strato diffusivo $1/\kappa$, come mostrato nelle figure 7 e 8, dove sono riportate curve di potenziale calcolate analiticamente dalle teorie di Deryagin-Laundau (1941) e Verwey-Overbeek (1948) a cui si rimanda per ulteriori approfondimenti.

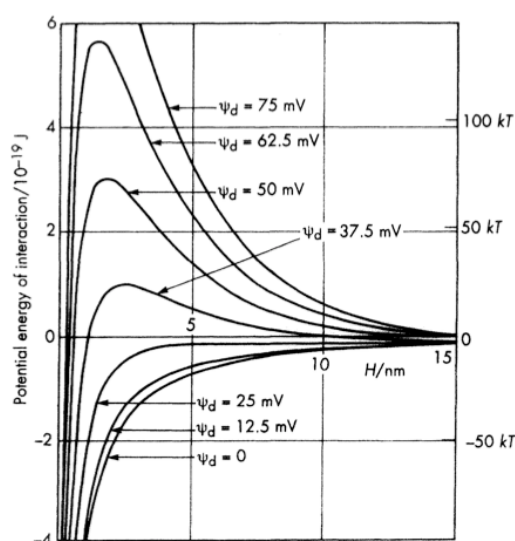


Figura 7. Curve di potenziale calcolate per vari valori del potenziale di Stern ψ_d per un sistema a 298 K fra due particelle dal diametro di 10^{-7} m. Sulla destra è riportata una scala delle energie termiche da confrontare con il valore del massimo per valutare la stabilità del sistema.

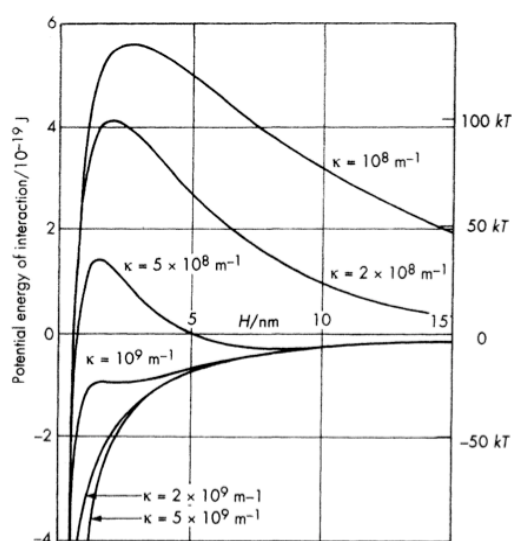


Figura 8. Curve di potenziale per vari valori del parametro κ calcolate a 289 K per due particelle con diametro di 10^{-7} m. All'aumentare dello spessore dello strato diffuso, cioè al diminuire di κ , aumenta la stabilità del sistema.

Il comportamento delle curve di potenziale e quindi degli stessi colloidi al variare del parametro κ merita un ulteriore commento. I numerosi studi e teorie compiuti sulla stabilità dei colloidi in soluzione hanno permesso di comprendere anche la loro forte sensibilità a piccole aggiunte di elettrolita, potendo definire una grandezza caratteristica nota come “*concentrazione di coagulazione critica*”. Si è notato tale fenomeno molte volte anche nel corso delle analisi effettuate in laboratorio. L'aggiunta di poche gocce di soluzioni molto diluite di NaCl in acqua (10^{-2} M) è in grado di provocare infatti una repentina coagulazione e precipitazione delle nanoparticelle di

argento sul fondo. Ciò è dovuto al fatto che gli ioni di trisodio citrato, l'agente stabilizzante delle nanoparticelle sintetizzate, durante l'aggiunta della soluzione salina, vengono scalzati e rimpiazzati dagli ioni Cl^- riducendo lo spessore dello strato diffusivo, proprio a causa delle differenti dimensioni degli ioni. In questo modo aumenta κ e diminuisce l'interazione repulsiva del doppio strato, provocando l'avvicinamento delle nanoparticelle ad una distanza tale da far prevalere le forze attrattive di Van der Waals e a portare alla conseguente precipitazione.

4.3 Sintesi di nanoparticelle in soluzione acquosa

4.3.1 Introduzione

I metodi utilizzati per produrre nanoparticelle metalliche in soluzione acquosa sono moltissimi, ognuno dei quali permette di ottenere colloidali con caratteristiche diverse fra loro. Ogni reazione di sintesi prevede la presenza di un sale metallico e di un agente riducente, il quale ha il duplice ruolo prima di promuovere la reazione redox e poi di stabilizzare la nanoparticella, formando il doppio strato elettrico attorno ad essa.

Proprio la possibilità di utilizzare diversi sali metallici e agenti riducenti, oltre alla variazione delle loro concentrazioni e degli altri parametri sperimentali, ha permesso lo sviluppo di molteplici metodi, ognuno dei quali ha reso possibile l'ottenimento di particelle con dimensioni, forme e stabilità diverse. Inoltre, come sarà mostrato in seguito, è possibile funzionalizzare la superficie delle particelle stesse aggiungendo varie molecole in soluzione che si legano al metallo per conferire caratteristiche particolari di stabilità o reattività [Daniel (2003)], per legarle ad una superficie vetrosa [Chumanov (1995), Grabar (1996), Goss (1991)], o ancora per ottenere core-shell formate da due metalli diversi [Lehui Lu (2002), Link (1999)], ampliando in questo modo lo spettro delle possibili applicazioni e impieghi dei colloidali stessi.

Dopo che il sale metallico è stato disciolto in acqua deionizzata la soluzione presenta i cationi metallici M^+ liberi che, con l'aggiunta dell'agente riducente, si riducono a M^0 e contemporaneamente aggregano fino alle dimensioni nanometriche, venendo poi stabilizzate dalla formazione del doppio strato elettrico, come schematizzato dalla figura 9.

La reazione chimica che avviene è quindi una classica reazione di ossidoriduzione, la quale prevede una fase di nucleazione (a cui è associata un'energia di attivazione) e successivamente una di accrescimento, fasi che sono già state oggetto di studio in precedenza e su cui non si è ritenuto opportuno soffermarsi ulteriormente [Lucotti (2005), Pesapane (2005)].

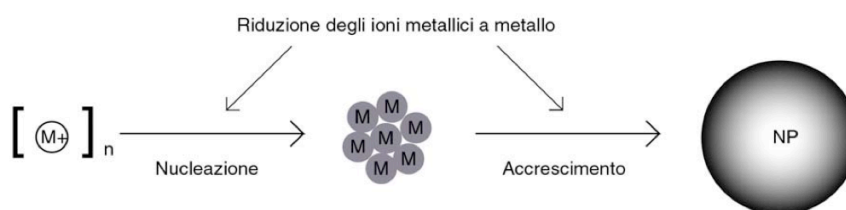


Figura 9. Nucleazione ed accrescimento di una nanoparticella in soluzione ad opera dell'agente riducente.

Nell'attività sperimentale di questa tesi sono stati sintetizzati quasi esclusivamente colloidali di argento e oro mediante trisodio citrato, che è l'agente riducente di gran lunga più utilizzato per le sue buone proprietà di stabilizzante. Si analizzeranno ora in modo dettagliato i metodi di sintesi che permettono di ottenere questi colloidali, oltre alle loro proprietà ottiche di assorbimento plasmonico.

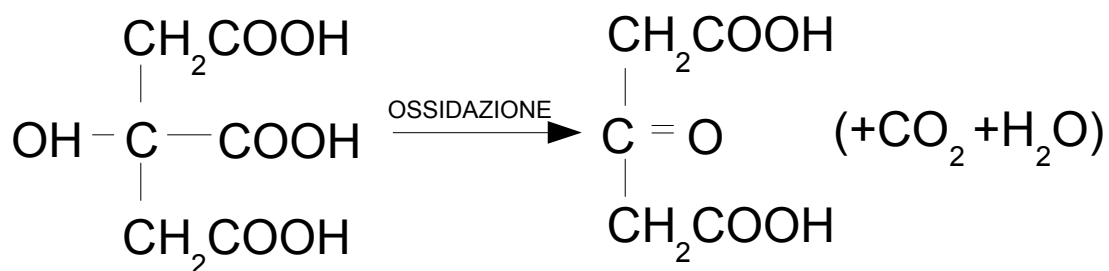
4.3.2 Sintesi di nanoparticelle di argento con trisodio citrato

Il metodo più utilizzato per ottenere questo tipo di nanoparticelle è quello classico di Lee-Meisel (1982) che viene di seguito riportato:

1. Si preparano 100 ml di una soluzione di nitrato di argento $AgNO_3$ 10^{-3} M in acqua deionizzata
2. Si preparano 4 ml di soluzione 1% di trisodio citrato in acqua deionizzata
3. Si riscalda sino ad ebollizione della soluzione di $AgNO_3$ in un becker con agitatore magnetico
4. Si aggiunge la soluzione del punto 2 quando entrambe sono al punto di ebollizione
5. Si mantiene la soluzione a bollire e in agitazione meccanica per 1 ora per completare la riduzione

Nel processo di sintesi di Lee-Meisel (1982) gli step di ebollizione si rendono necessari in quanto il trisodio citrato è un agente riducente troppo blando a temperatura ambiente, non in grado quindi di promuovere il processo di riduzione se non a temperature prossime a quelle di ebollizione dell'acqua.

Durante la reazione si ha la riduzione di Ag^+ ad Ag^0 , mentre il processo di ossidazione del trisodio citrato risulta più complicato da descrivere, in quanto coinvolge la formazione di più prodotti a seconda della cinetica e della temperatura di sintesi. La letteratura a riguardo [Kuyper (1933)] riporta infatti un'ossidazione dell'acido citrico, con perdita di un gruppo acido e trasformazione nell'acido dicarbossilico dell'acetone. Di conseguenza si ha lo sviluppo di anidride carbonica e acqua secondo la seguente reazione:



Il trisodio citrato in soluzione risulterà parzialmente dissociato in funzione della sua concentrazione, del suo pKA e del pH. Successivamente a questo step Kuyper (1933) riporta la formazione di piccoli volumi di acetone nella soluzione acquosa, oppure di una miscela di formaldeide, acido formico, anidride carbonica e acqua a seconda della temperatura di sintesi.

Ad ogni modo, non ritenendo utile ai fini dello scopo del lavoro approfondire ulteriormente questi aspetti, è sufficiente dire che, terminato il raffreddamento, la stabilizzazione delle nanoparticelle sintetizzate in soluzione acquosa è affidata sia all'acido dicarbossilico dell'acetone (la parte ossidata), sia al citrato (la parte non ossidata) che risulta sempre in eccesso rispetto a quello necessario per la completa riduzione dello ione Ag^+ ad Ag^0 metallico. Queste due molecole sono quindi entrambe responsabili della formazione del doppio strato elettrico attorno alla particella che ne riduce l'energia superficiale.

Considerando ora per semplicità solo l'azione dello ione trisodio citrato, l'interazione che si crea durante il processo di ossidoriduzione tra la superficie metallica di argento e l'agente riducente è schematizzata in figura 10.

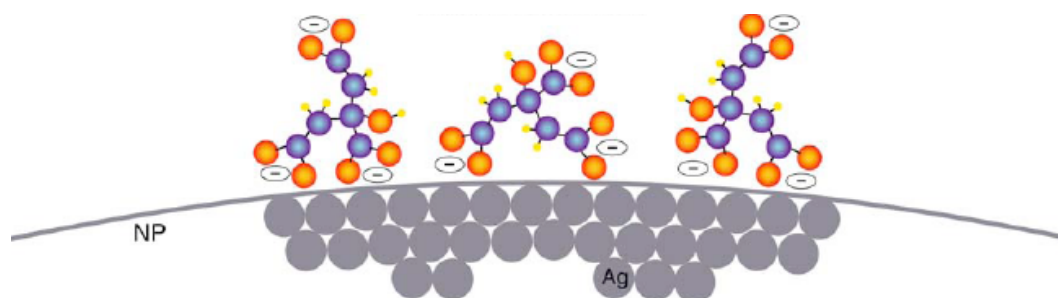


Figura 10. La stabilizzazione delle nanoparticelle (NP) ad opera del trisodio citrato che, dopo aver perso in soluzione acquosa le due molecole di acqua, rimane con tre gruppi acidi deprotonati. In questo modo i tre pendagli carichi negativamente si attaccano saldamente alla particella e creano una shell elettrostatica (Stern layer), in grado di evitare la coalescenza delle particelle.

Nella figura 11 si mostra una soluzione di nanoparticelle di argento ottenuta tramite sintesi Lee-Meisel (1982) all'interno della beuta utilizzata per tutte le sintesi.

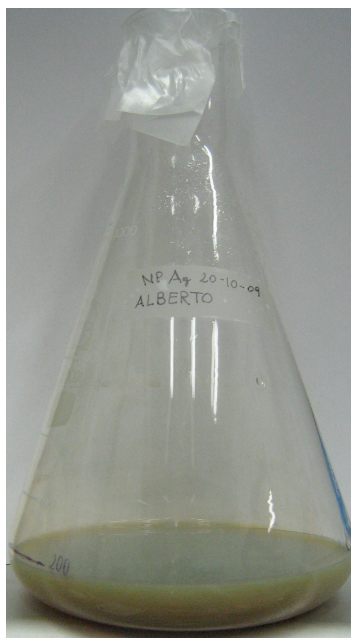


Figura 11. Nanoparticelle di argento stabilizzate con trisodio citrato ottenute tramite metodo di Lee-Meisel (1982). Da notare il tipico colore “greenish pale yellow”.

Per verificare l'eventuale riproducibilità delle sintesi in termini di diametri e distribuzioni delle nanoparticelle si è deciso di effettuarne 6, cercando a tal fine di mantenere il più possibile costanti tutti i parametri sperimentali in gioco durante il processo, come ad esempio l'utilizzo della stessa beuta per ogni soluzione (figura 13), la stessa temperatura di riscaldamento della piastra per l'ebollizione (250°C) e lo stesso numero di giri dell'agitatore magnetico (1000 RPM) con cui la soluzione viene rimescolata, oltre naturalmente all'attento controllo delle concentrazioni di sale di argento e trisodio citrato indicati per la sintesi. Inoltre, sempre con questo obiettivo, le vetrerie utilizzate sono state per ogni sintesi lavate accuratamente con acido nitrico e risciacquate più volte con acqua deionizzata, al fine di assicurare l'eliminazione di cluster di nanoparticelle sul vetro che potessero in qualche modo alterare i processi di nucleazione e accrescimento agendo loro stessi da centri di nucleazione eterogenea. Infine per tutta la durata della fase di ebollizione è stato ricondensato in parte il vapore uscente durante l'ebollizione, cercando di mantenere in questo modo il più possibile simili i volumi finali dei differenti colloidi sintetizzati.

La principale tecnica utilizzata per caratterizzare i colloidali prodotti è stata la spettroscopia UV-VIS, la quale permette di ottenere informazioni sulla posizione del picco plasmonico e sulla larghezza a metà altezza del picco stesso. Il primo parametro, come sarà mostrato in seguito, dà informazioni sul valore del diametro medio delle nanoparticelle ottenute, il secondo invece sulla distribuzione dei

diametri stessi. In questo modo si può ottenere una stima sufficientemente dettagliata del tipo di particelle colloidali con una tecnica rapida come la registrazione di uno spettro di assorbimento. Nella figura 12 si riportano gli spettri di assorbimento dei 6 differenti colloidali ottenuti, dove sono evidenziati i loro picchi di assorbimento plasmonico.

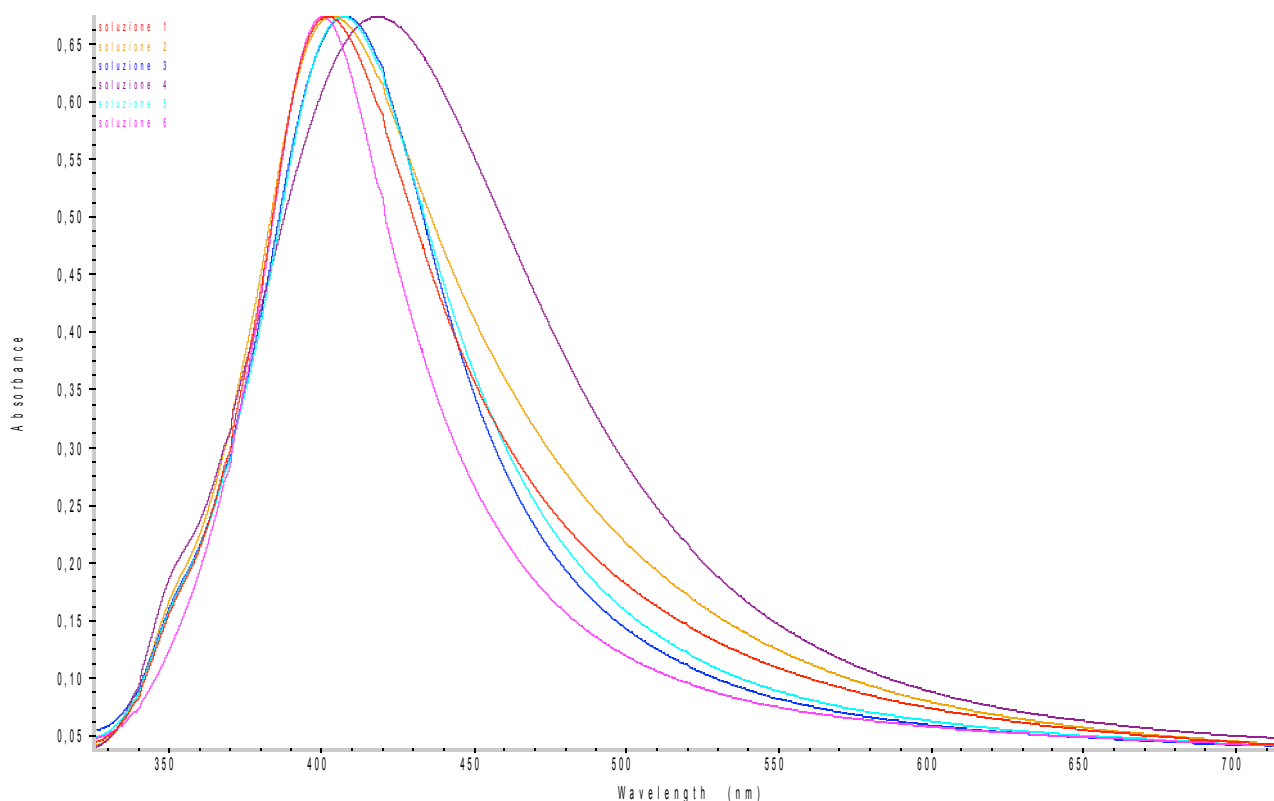


Figura 12. Spettri di assorbimento per le 6 soluzioni colloidali di argento ottenute con il metodo di Lee-Meisel (1982), ognuna delle quali ha una particolare posizione del picco di assorbimento e della larghezza a metà altezza.

Nella tabella 3 si riportano i valori del picco di assorbimento e della larghezza a metà altezza (FWHH full width half height) in lunghezze d'onda e in elettronvolt dei colloidali.

	Soluzione 1	Soluzione 2	Soluzione 3	Soluzione 4	Soluzione 5	Soluzione 6
λ_{picco} [nm]	402	404	408	419	407	400
FWHH [nm]	80	94	76	117	80	63
FWHH [eV]	0,61	0,68	0,56	0,81	0,59	0,48

Tabella 3. Lunghezze d'onda dei picchi e valori della larghezza a metà altezza delle 6 soluzioni Lee-Meisel (1982) espressi sia in lunghezze d'onda che in elettronvolt [eV]*.

* Per la conversione lunghezza d'onda-energia si è utilizzata la relazione $E=(h\cdot c)/\lambda$, con la costante di Planck $h=6,63\cdot 10^{-34}$ J·s e la velocità della luce $c=3\cdot 10^8$ m/s, in questo modo il valore dell'energia che si ottiene è espresso in J. Per passare agli eV occorre applicare il fattore di proporzionalità $1\text{ eV} = 1,6\cdot 10^{-16}$ J.

Nonostante tutti gli accorgimenti prestatati durante il processo di sintesi delle varie soluzioni, come è possibile vedere sia dagli spettri UV-VIS che dalla tabella 3 riassuntiva, permane comunque una certa variabilità dei due parametri fondamentali. I picchi plasmonici vanno dai 400 nm della soluzione 6 fino ai 419 della soluzione 4, mentre le larghezze a metà altezza dai 63 nm della 6 fino ai 117 della 4, con tutte le altre soluzioni che presentano parametri intermedi.

Confrontando le soluzioni quindi è possibile affermare che la 4 avrà un diametro medio delle particelle maggiore delle altre per l'elevato valore del picco plasmonico ma anche un'ampia distribuzione di tali diametri a causa del maggiore valore della larghezza a metà altezza, mentre un discorso esattamente opposto può essere fatto per la soluzione 6.

Per avere una stima approssimata della dimensione media delle nanoparticelle si trovano in letteratura correlazioni fra il diametro medio delle nanoparticelle sintetizzate e la lunghezza d'onda di assorbimento plasmonico. In figura 13 si riporta a tal proposito una di queste curve di correlazione relativa alle nanoparticelle di argento in soluzione acquosa. Nell'intervallo mostrato si evidenzia una relazione di linearità.

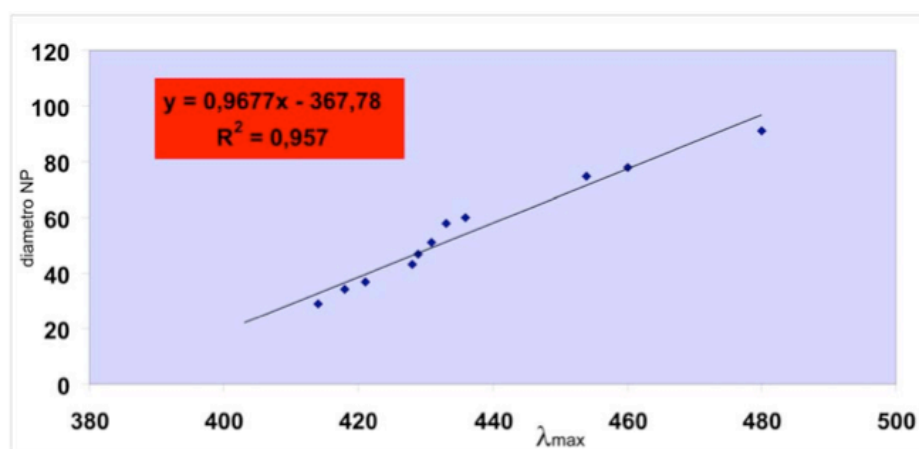


Figura 13. Valori del diametro medio delle nanoparticelle di argento in soluzione acquosa in funzione del massimo di assorbimento, espressi entrambi in nanometri. I dati sono presi da letteratura [Wilson].

Occorre notare che tramite i parametri operativi utilizzati durante le sintesi sono state ottenute mediamente particelle dai diametri inferiori rispetto a quanto riportato in letteratura. Generalmente infatti la letteratura a riguardo afferma che il picco plasmonico di una soluzione Lee-Meisel (1982) si trova attorno ai 420 nm. Questo scostamento di valori tra quelli sperimentali riportati nella tabella 3 e quelli di letteratura non deve sorprendere, poiché la variabilità delle dimensioni e delle distribuzioni delle particelle ottenute tramite questo tipo di sintesi è molto elevata, a causa sia dell'azione del citrato sia di tutta la molteplicità di parametri di cui la sintesi è funzione. Per dare

un'idea della forte variabilità di dimensioni a cui queste particelle sono soggette in funzione di tutte le condizioni sperimentali di sintesi, si possono trovare articoli in letteratura che affermano di aver ottenuto colloidali di argento Lee-Meisel (1982) con un picco plasmonico a 434 nm [Rivas (2001)], ben oltre quindi il valore “standard” di 420. In altri studi si è notato che anche variazioni molto modeste della temperatura di ebollizione del colloide portano ad ottenere particelle con dimensioni e distribuzioni completamente diverse fra loro [Cyrankiewicz (2007)].

Inoltre, data la forte influenza del pH della soluzione sul processo di aggregazione delle nanoparticelle [Cyrankiewicz (2007)], si potrebbe pensare che già piccole variazioni di acidità del vetro della beuta siano fondamentali nel definire la nucleazione e l'accrescimento, giustificando la necessità di accurati risciacqui con acqua deionizzata dopo ogni lavaggio con acido nitrico.

Da quanto detto finora si può capire che è praticamente impossibile ottenere con questo metodo di sintesi colloidali perfettamente riproducibili in termini di diametri medi e larghezze a metà altezza dei loro picchi, tuttavia, come sarà mostrato nei paragrafi seguenti, ciò non implica a priori l'impossibilità di effettuare analisi SERS semi-quantitative, a patto di utilizzare sempre il colloide proveniente sempre dallo stesso batch di sintesi.

Oltre alle nanoparticelle di forma approssimativamente sferica, si ottengono durante la sintesi dei veri e propri rods (bastoncelli o bacchette), caratterizzati da una forma molto allungata in una direzione. La formazione dei rods è imputabile all'azione non uniforme del citrato durante il processo di riduzione, che porta ad avere uno stadio di accrescimento caratterizzato da una forte anisotropia (figura 14).

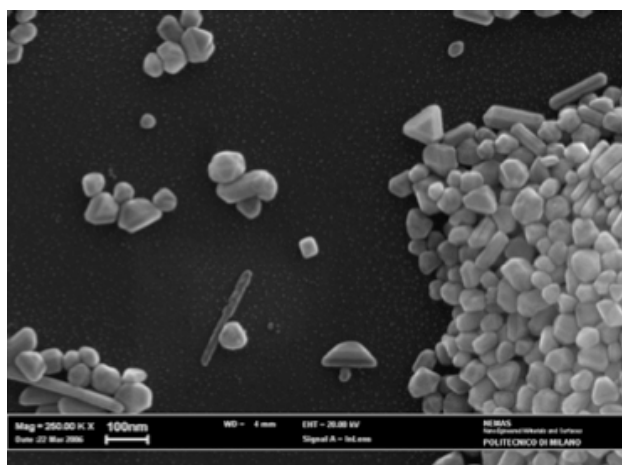


Figura 14. Immagine SEM di nanoparticelle di argento dove è possibile notare la forma non perfettamente sferica delle nanoparticelle, l'esistenza di una distribuzione dei diametri e la presenza di alcuni bastoncelli.

Data la mancanza di forme perfettamente sferiche risulta quindi inevitabile quando si parla di diametro di una singola nanoparticella riferirsi ad un valore medio.

La presenza dei bastoncini al termine della sintesi porta ad un doppio contributo di risonanza nello spettro di assorbimento, che si manifesta in uno splitting vero e proprio della frequenza di risonanza plasmonica dovuto all'eccitazione plasmonica longitudinale e trasversale del rod stesso [Pesapane (2005)]. Tale splitting però non risulta visibile negli spettri della figura 12 in quanto l'esiguo numero dei bastoncini dà un contributo troppo piccolo per avere un segnale rilevabile. Sarebbe possibile tuttavia far emergere il segnale dei rods attraverso la centrifugazione dei colloidi e la registrazione di spettri di assorbimento del solo precipitato ricco di particelle grosse e bastoncini. In questo modo infatti si eliminerebbe gran parte del contributo prevalente di risonanza plasmonica delle particelle più piccole che rimarrebbero in sospensione.

4.3.3 Misura del coefficiente di estinzione molare

Tramite la spettroscopia UV-VIS è possibile stimare il coefficiente di estinzione molare per ogni soluzione colloidale ottenuta una volta note le quantità di reagenti e il volume finale di sintesi. Essendo infatti nota la quantità di argento utilizzata e il volume finale del colloide, si può pensare di ottenere una stima sufficientemente accurata della sua concentrazione. Nel caso della soluzione 4 tale concentrazione è risultata essere pari a 2,1 mM. Considerando ora la nota legge di Lambert-Beer secondo la quale:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

dove A è l'assorbanza adimensionale, c è la concentrazione [M], l è la lunghezza della cuvetta di quarzo con cui si esegue la misura [cm], mentre ε è il coefficiente di estinzione molare [M⁻¹cm⁻¹]. Si nota a questo punto che è possibile correlare in maniera lineare l'assorbanza del colloide alla sua concentrazione ricavando delle rette di taratura, dove il valore del coefficiente di estinzione molare è la pendenza di tale retta, come schematizzato nella figura 15. A tal proposito è utile ricordare che il valore del coefficiente ε è una funzione della lunghezza d'onda λ .

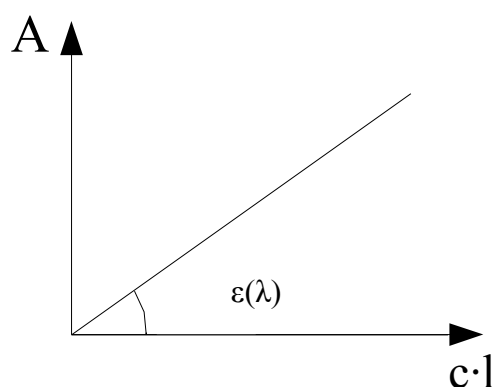


Figura 15. Proporzionalità nella legge di Lambert-Beer tra assorbanza A e la concentrazione moltiplicata per lo spessore della cuvetta utilizzata $c \cdot l$.

Dalla letteratura [Catenacci (2001)] si è trovato che il valore di ϵ per una soluzione Lee-Meisel (1982) con un picco a 420 nm è di $5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Si è deciso quindi di misurare lo spettro di assorbimento della soluzione 4 (picco a 419 nm) per verificare se questo valore è valido anche per il colloide sintetizzato in questo lavoro di tesi. Dopo aver diluito il colloide di partenza dieci volte, passando quindi ad una concentrazione di $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, si è registrato lo spettro di assorbimento riportato in figura 16.

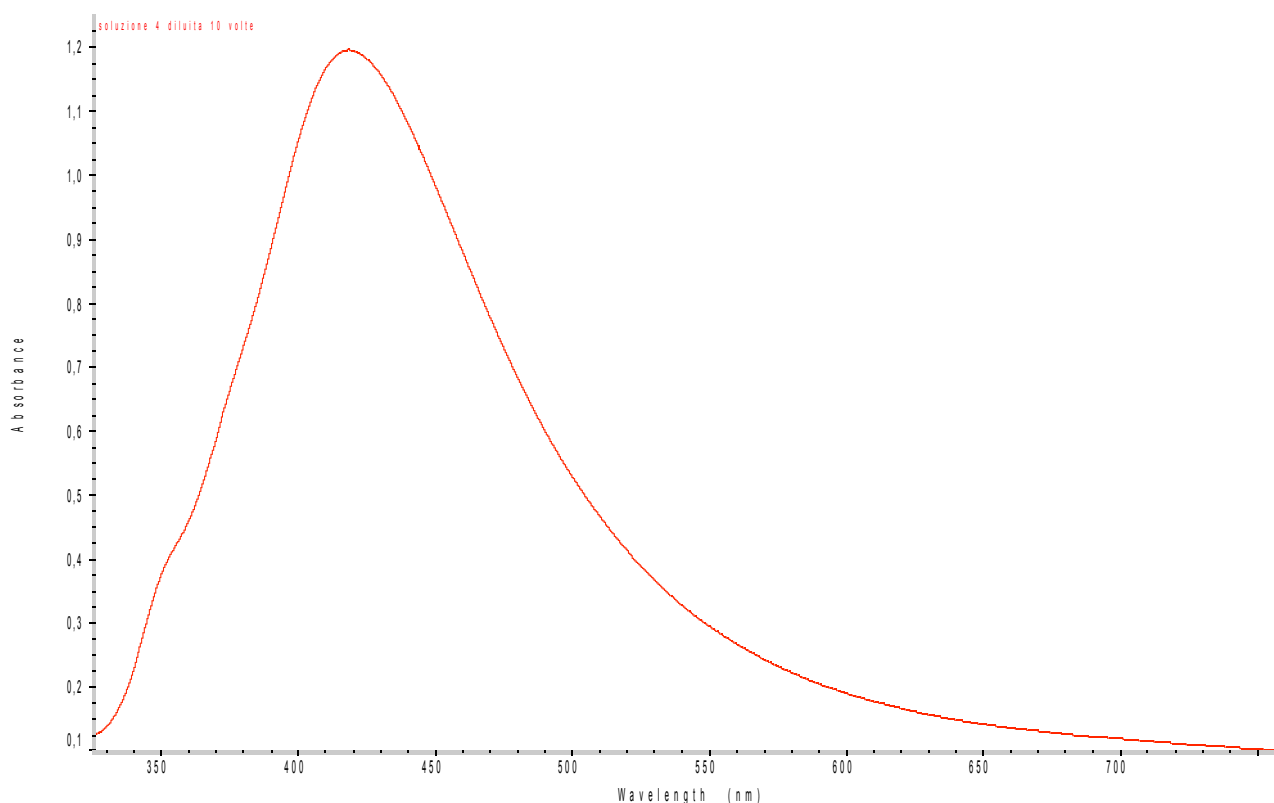


Figura 16. Spettro della soluzione 4 diluita. Poiché la legge di Lambert-Beer vale per soluzioni diluite, la soluzione è stata diluita per evitare ad elevati valori di A correlazioni non più lineari tra A e c .

Il valore di assorbanza a 419 nm risulta essere di 1,196. Esplicitando ora il valore di ϵ riferito alla lunghezza d'onda del picco si trova che:

$$\epsilon_{420} = \frac{1,196}{(2,1 \cdot 10^{-4}) \cdot 1} = 5695 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Il valore trovato è uguale a quello indicato dalla letteratura entro l'errore sperimentale.

Occorre notare che, per quanto riguarda il valore molare calcolato, il numeri di moli a cui ci si riferisce in questo caso è quello degli atomi di argento e non delle nanoparticelle, come varrà invece nel caso dei colloidali di oro dove il valore di ϵ è ricavato in maniera più consueta riferendosi all'oggetto che assorbe (nanoparticella). Ciò è dovuto al fatto che con un'ampia distribuzione di dimensioni delle nanoparticelle di argento non è possibile stimare in maniera abbastanza precisa il numero di atomi che formano una nanoparticella, cosa invece possibile nel caso dei colloidali di oro che presentano una distribuzione di dimensioni molto più stretta (*cf. paragrafi seguenti*). Il valore del coefficiente di estinzione molare calcolato per il caso dell'argento può essere meglio interpretato quindi come un fattore di proporzionalità tra la concentrazione del sale e l'assorbanza. Esso oltretutto risulta funzione della distribuzione di particelle ottenute durante sintesi, ed è quindi intrinsecamente poco significativo nei confronti delle nanoparticelle stesse a causa della grande variabilità a cui è soggetto.

Fatta questa precisazione, considerando ora la soluzione 6, che presenta dimensioni medie delle nanoparticelle inferiori e una distribuzione di diametri più stretta, sono stati registrati spettri a varie diluizioni al fine di ottenere una retta di taratura e la stima di un valore di ϵ riferito alla λ_{\max} che fosse mediato su più punti (figura 17).

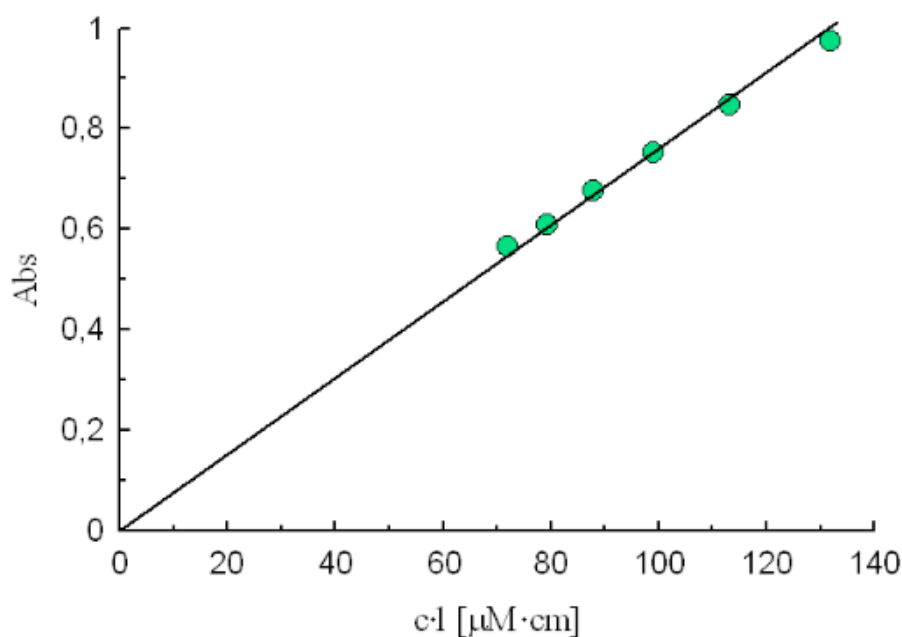


Figura 17. Retta di taratura per la soluzione 6: i valori di assorbanza degli spettri misurati sono proporzionali alla concentrazione della soluzione, riportata in microM per cm.

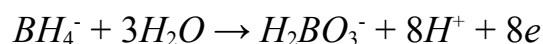
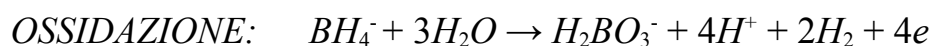
Effettuando una regressione lineare si trova che per questa soluzione, con un picco attorno a 400 nm, il coefficiente angolare ϵ_{400} vale $7601 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Si potrebbe quindi pensare che un minore diametro medio delle nanoparticelle e una più piccola distribuzione possa produrre un aumento del coefficiente di estinzione molare. Tuttavia non esistono allo stato attuale informazioni in letteratura sufficientemente dettagliate per trarre delle conclusioni definitive.

4.3.4 Sintesi di nanoparticelle di argento con boridruro di sodio

Fra i moltissimi metodi di sintesi che si trovano in letteratura uno dei più importanti è quello che prevede la riduzione degli ioni di argento mediante l'utilizzo del boridruro di sodio [Seney (2009), Ledwith (2007)]. Il processo di sintesi può essere suddiviso nei seguenti passaggi:

1. Si preparano 190 ml di soluzione di nitrato di argento (AgNO_3) $2,65 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ in acqua deionizzata
2. Si preparano 10 ml di soluzione $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ di NaBH_4 in acqua deionizzata
3. Si raffreddano entrambe le soluzioni con ghiaccio
4. Mentre la soluzione di nitrato di argento è in agitazione si aggiunge la soluzione del punto 2.
5. Si mantiene in agitazione la miscela fino all'avvenuta colorazione (giallo intenso)

La reazione di ossidoriduzione che avviene durante questa sintesi può essere schematizzata nel seguente modo:



Il boroidruro è un agente riducente molto più forte del trisodio citrato. Lo stadio di nucleazione ha un'energia di attivazione tanto minore rispetto alla sintesi col citrato che è raccomandato generalmente un raffreddamento con ghiaccio di entrambe le soluzioni prima della miscelazione, al fine avere una cinetica di reazione meno violenta. Tuttavia in questo lavoro di tesi sono state effettuate sintesi anche senza lo step del raffreddamento (punto 3). L'eliminazione di questo step non sembra portare a distribuzioni e dimensioni molto differenti rispetto a quelle che si ritrovano in letteratura [Lucotti (2005)]. Poiché la nucleazione è molto violenta si creeranno molti più nuclei, portando ad una diminuzione dello stadio di accrescimento delle nanoparticelle che infatti hanno diametri attorno ai 10 nm. Per ottenere nanoparticelle stabili nel tempo inoltre è stato necessario utilizzare anche il trisodio citrato, applicando quindi una variante alla soluzione "standard" descritta prima. Il citrato è stato aggiunto già nella soluzione di nitrato di argento in quantità paragonabili a quelle necessarie per la sintesi Lee-Meisel (1982), rendendo in questo modo il colloide stabile per mesi. In figura 18 si riporta una soluzione di nanoparticelle di argento ottenute con questo metodo.



Figura 18. Nanoparticelle di argento ottenute mediante riduzione con boroidruro di sodio e stabilizzate con citrato. La colorazione limpida della soluzione è dovuta alla presenza di nanoparticelle dal diametro molto piccolo (~10 nm). Con questo metodo di sintesi, se non si aggiunge il citrato, lo strato interno del doppio strato elettrico è principalmente costituito dagli ioni BH_4^- e HBO_3^- che si legano meno fortemente all'argento rispetto al citrato [Creighton (1979)], diminuendo in questo modo la stabilità del colloide nel tempo.

In figura 19 si riporta uno spettro di assorbimento di tale colloide stabilizzato, che presenta un picco a 400 nm e una larghezza a metà altezza di 73 nm.

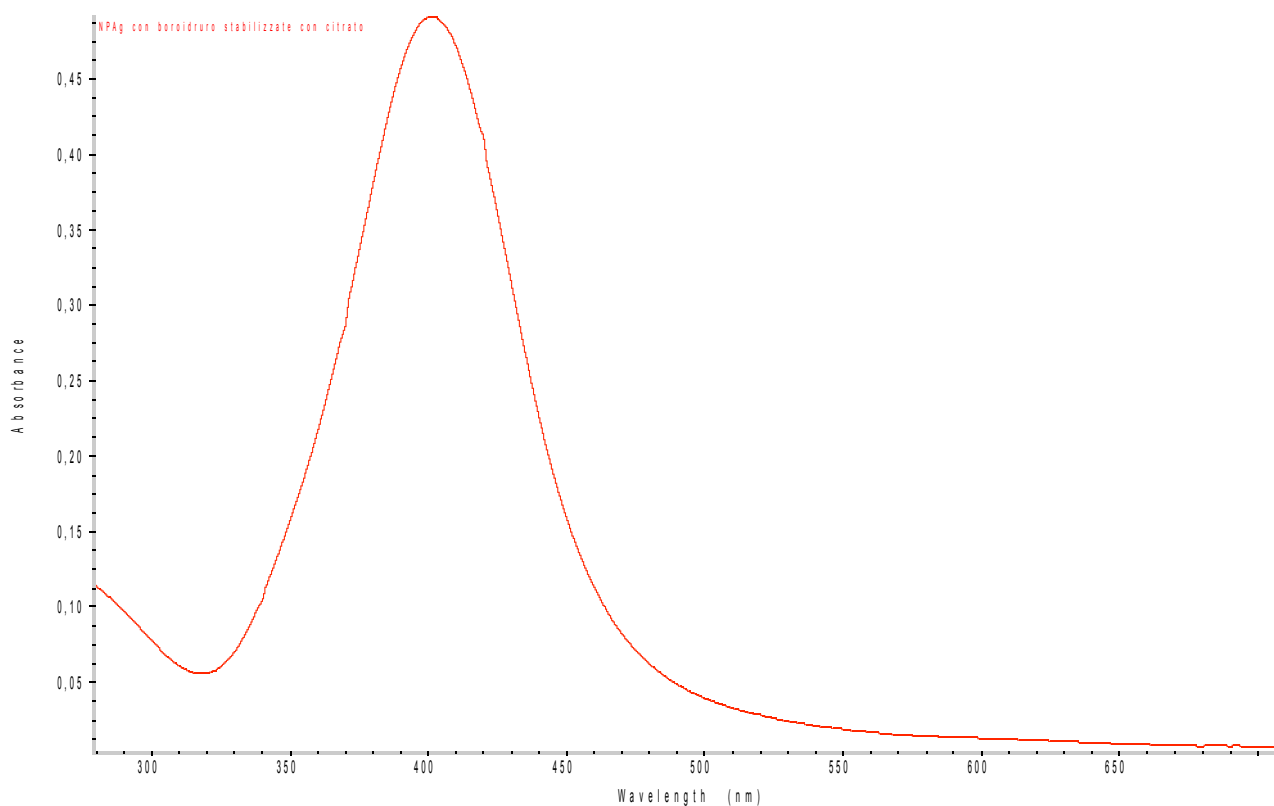


Figura 19. Spettro di assorbimento della soluzione di nanoparticelle di argento stabilizzate con citrato mostrata in figura 18.

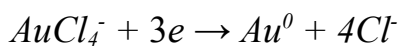
4.3.5 Sintesi di nanoparticelle di oro con trisodio citrato

Come per i colloidali di argento anche per quelli di oro si è sviluppata nel corso del tempo una vasta letteratura, la quale ha permesso di caratterizzare in maniera precisa l'effetto della variazione dei parametri di sintesi sul prodotto finale ottenuto. Considerando ad esempio il lavoro di Turkevich (1951) si ha un'idea delle molteplici possibilità che si hanno per sintetizzare colloidali di oro.

Fra tutti i metodi di sintesi descritti nell'articolo di Turkevich (1951) si è scelto di seguire quello che prevede la sintesi dei colloidali di oro mediante riduzione con trisodio citrato. La sintesi di tali colloidali prevede i seguenti passaggi:

1. Si preparano 190 ml di soluzione di HAuCl_4 $2,5 \cdot 10^{-5}$ M in acqua deionizzata
2. Si preparano 10 ml di soluzione di trisodio citrato all'1% in peso in acqua deionizzata
3. Si portano entrambe le soluzioni a bollore mantenendole in agitazione meccanica
4. Si aggiunge la soluzione di trisodio citrato in quella di oro quando entrambe sono a bollore
5. Si mantiene la soluzione a bollore e in agitazione per un'ora per completare la riduzione

Nei primi istanti dopo l'aggiunta della soluzione di trisodio in quella di oro la miscela assume un colore viola scuro, a testimonianza dell'inizio del processo di nucleazione, per poi virare lentamente ad un rosso intenso al procedere del processo di accrescimento delle nanoparticelle. La reazione di riduzione che coinvolge gli ioni $AuCl_4^-$ è la seguente:



Analogamente a quanto succede per la nucleazione delle nanoparticelle di argento l'ossidazione del citrato, dalla quale si forma dall'acido dicarbossilico dell'acetone, funge da catalizzatore nella reazione di nucleazione delle nanoparticelle d'oro [Abid (2003), Kuyper (1933)]; l'acido dicarbossilico infatti, con i suoi due gruppi acidi, è in grado di coordinare lo ione $(AuCl_2)^+$ e quindi di promuovere la nucleazione delle nanoparticelle d'oro (figura 20).

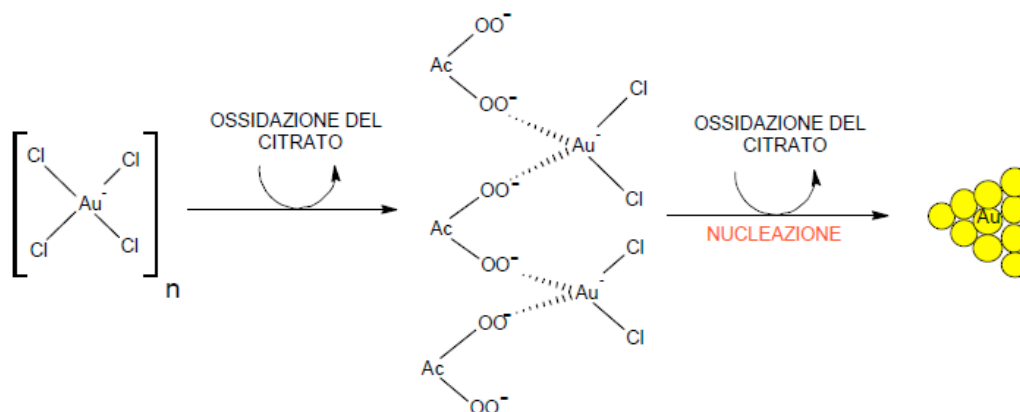


Figura 20. Schematizzazione del processo di nucleazione delle nanoparticelle d'oro ($Ac = C_5H_4O$).

Terminato il processo di sintesi la stabilizzazione delle nanoparticelle è dovuta principalmente ai due gruppi acidi dell'acido dicarbossilico dell'acetone carichi negativamente, in maniera esattamente analoga al caso dei colloidali di argento (figura 21).

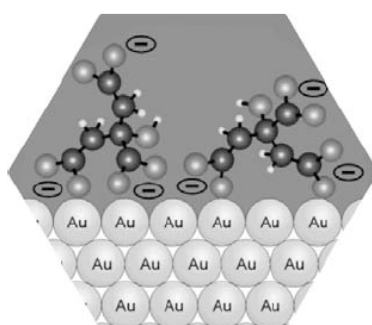


Figura 21. Rappresentazione dello strato interno del doppio strato elettrico che si forma su una nanoparticella di oro al termine della sintesi.

In figura 22 si riporta l'aspetto di una soluzione colloidale di oro ottenuta tramite questo metodo.

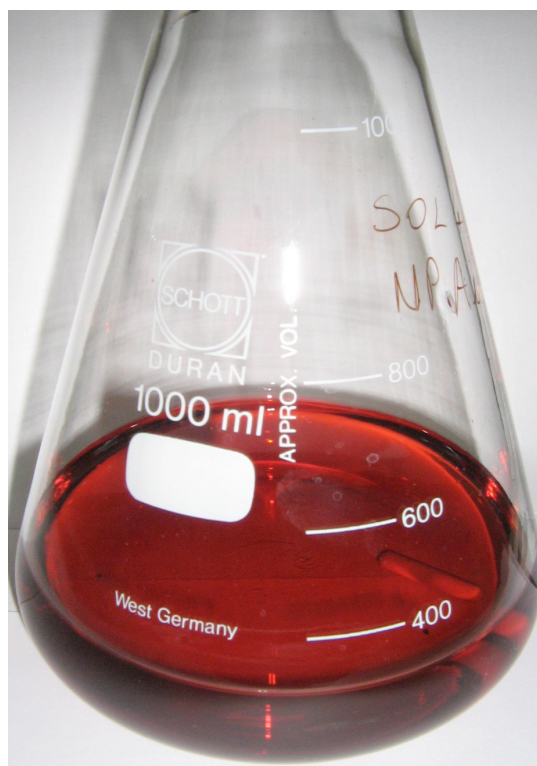


Figura 22. Soluzione colloidale di nanoparticelle di oro ottenute mediante riduzione con trisodio citrato. La soluzione presenta una colorazione rosso intensa e limpida, a causa delle ridotte dimensioni delle nanoparticelle e dell'assenza di bastoncelli in grado di promuovere lo scattering del colloide.

Tramite questo metodo di sintesi si ottengono nanoparticelle con un diametro medio di 20 nm ma soprattutto con una distribuzione di dimensioni molto ridotta. A testimonianza di ciò, oltre che dal supporto dei dati forniti dall'articolo di Turkevic (1951), si ha avuto un'ulteriore conferma della strettissima distribuzione di diametri che si viene a creare dall'impossibilità pratica di separare differenti dimensioni di nanoparticelle mediante centrifugazione. Infatti, centrifugando questi colloidi, non si è osservato infatti alcun spostamento apprezzabile del picco di assorbimento plasmonico, né variazioni della larghezza a metà altezza (*cfr. paragrafo 4.4*).

In figura 23 si riporta uno spettro di assorbimento di questo colloide, che presenta un picco di assorbimento plasmonico a 520 nm, in perfetto accordo con i dati di letteratura [*Xiaohui Ji (2007)*].

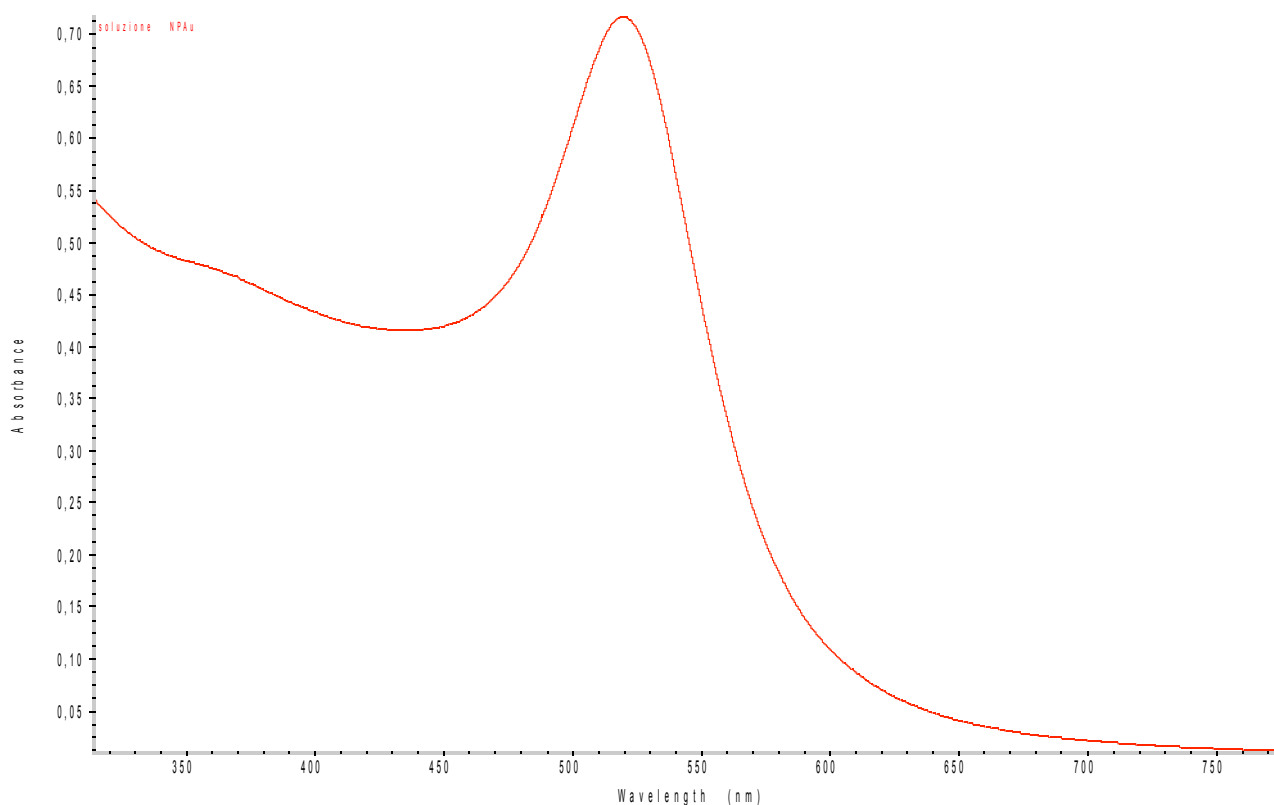


Figura 23. Spettro di assorbimento del colloide di oro della figura 22.

4.3.6 Misura del coefficiente di estinzione molare

Nel caso di colloidali di oro la formazione di nanoparticelle con un diametro medio definito e una distribuzione di diametri stretta permette una stima del coefficiente di assorbimento molare concettualmente diversa da quella fatta per i colloidali di argento, e più soddisfacente dal punto di vista teorico. Poiché infatti nel caso di questi colloidali è semplice stimare il numero di atomi di oro per nanoparticella, la concentrazione può essere vista in termini di moli di nanoparticelle e non di atomi, come nel caso dei colloidali di argento. Da ciò consegue naturalmente che i valori del coefficiente ϵ saranno di diversi ordini di grandezza differenti rispetto a quelli dell'argento e difficilmente comparabili. Per passare dalle moli di atomi a quelle di nanoparticelle occorre dividere la concentrazione della soluzione per il numero di atomi per nanoparticella. Considerando le nanoparticelle formatesi completamente sferiche e assumendo il loro diametro di 20 nm, secondo quanto affermato dall'articolo di Xiong Liu (2007), il numero di atomi per nanoparticella è di circa $2,47 \cdot 10^5$. Registrando uno spettro di assorbimento del colloide dopo una diluizione in acqua di 1:1 (concentrazione $1,25 \cdot 10^{-5}$ M) si ottiene un valore di assorbanza di 0,477 (figura 24).

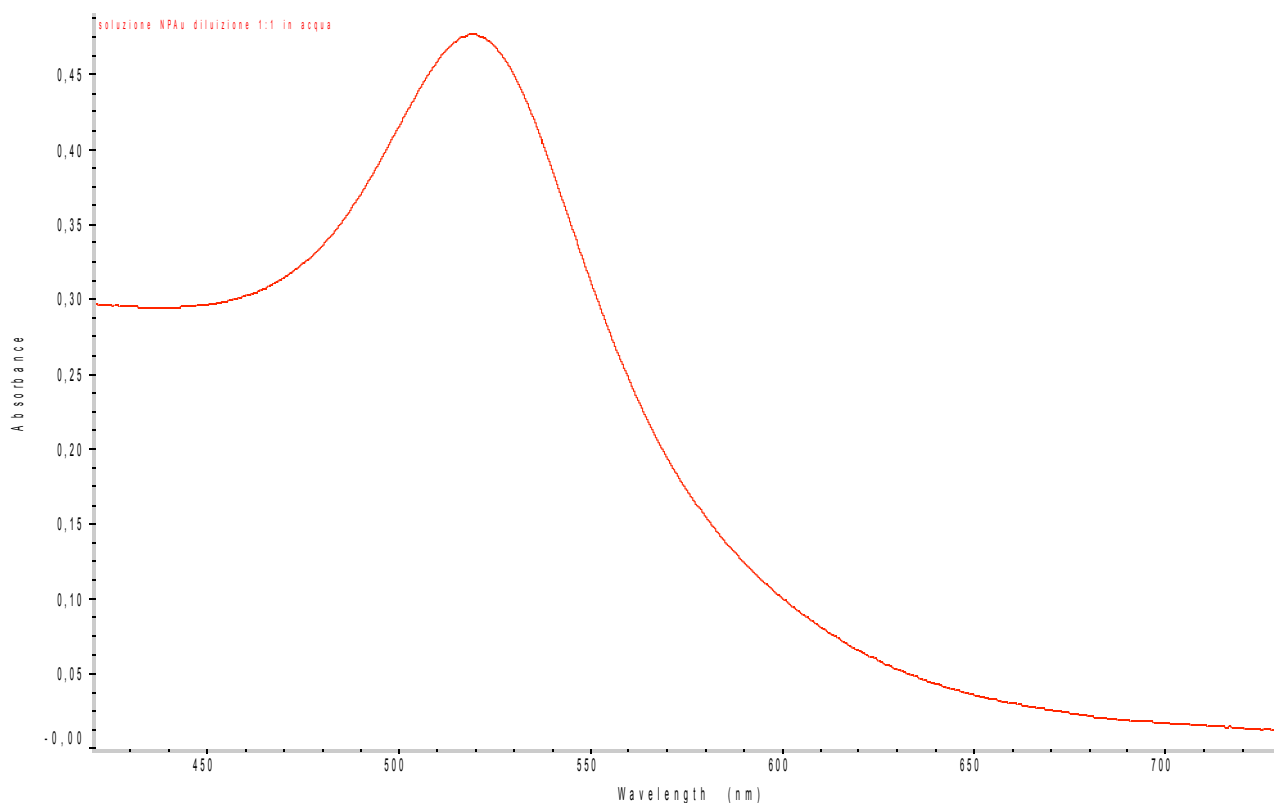


Figura 24. Soluzione di nanoparticelle di oro diluita 1:1 con acqua deionizzata. Il valore dell'assorbanza alla lunghezza d'onda del picco (520 nm) risulta di 0,477.

In questo modo utilizzando la legge di Lambert-Beer il valore di ϵ_{520} risulta di circa $9,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Questo valore rientra nell'ampio range di quelli riportati in letteratura per particelle da 20 nm [Jain (2006), Link (1999)], i quali sono peraltro molto contrastanti tra loro, con stime contrastanti che spaziano addirittura su due ordini di grandezza (da 10^7 a $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A rendere ulteriormente difficoltosa la possibilità di fare delle valutazioni precise sui valori del coefficiente ϵ di estinzione molare occorre dire inoltre che i valori di ϵ trovati riportati nell'articolo di Xiong Liu (2007) sono calcolati a partire da soluzioni colloidali che presentano un picco non a 520 nm, ma a 506. Inoltre, oltre alla lunghezza d'onda del picco e quindi della dimensione media delle nanoparticelle, per effettuare un confronto preciso occorrerebbe avere anche lo stesso valore della larghezza a metà altezza di cui si ritiene ragionevolmente che il coefficiente di estinzione possa essere funzione.

Se si considerano a questo punto tutte le variabili che influenzano una sintesi, la difficoltà pratica di controllarle in maniera accurata e la sensibilità del colloide già ad una piccola variazione di ognuna di esse, si può capire che ottenere soluzioni con dimensioni medie e distribuzioni perfettamente uguali rispetto a quelle riportate in letteratura risulti quasi impossibile, pregiudicando a priori la

possibilità di un confronto accurato con i coefficienti di estinzione misurati sperimentalmente.

4.3.7 Sintesi di nanoparticelle di oro concentrate con trisodio citrato

In questo paragrafo e nel prossimo si vuole dare un'idea della facilità con cui si può spostare il picco di assorbimento plasmonico (λ_{picco}) attraverso la variazione della concentrazione del sale impiegato durante la sintesi. Si può intuire facilmente come in condizioni di forte eccesso del sale di oro si possano ottenere nanoparticelle molto più grosse di quelle del metodo di Turkevich (1951), producendo sicuramente un maggiore numero di nanoparticelle, ma soprattutto aumentando molto lo stadio di accrescimento, proprio grazie alla maggior quantità di “carburante” (cioè del sale) in grado di far continuare questo stadio fino al suo esaurimento.

Le condizioni sperimentali e le procedure sono esattamente uguali a quelle utilizzate per la sintesi secondo il metodo di Turkevich (1951), tranne per la concentrazione del sale d'oro, con cui si sono ottenute soluzioni colloidali 10^{-3} M al posto del $2,5 \cdot 10^{-5}$ M indicato in letteratura. Anche in questo caso il colloide è stato mantenuto in agitazione meccanica e a bollore per un'ora, al fine di assicurare la completa riduzione del sale. Il picco plasmonico di questi colli di oro risulta molto spostato passando dagli usuali 520 ai 555 nm, come è possibile vedere dalla figura 25. Oltre al forte red-shift del picco di assorbimento si nota anche una larghezza a metà altezza nettamente maggiore, a testimonianza di distribuzioni di diametri molto più larghe e di una possibile parziale aggregazione.

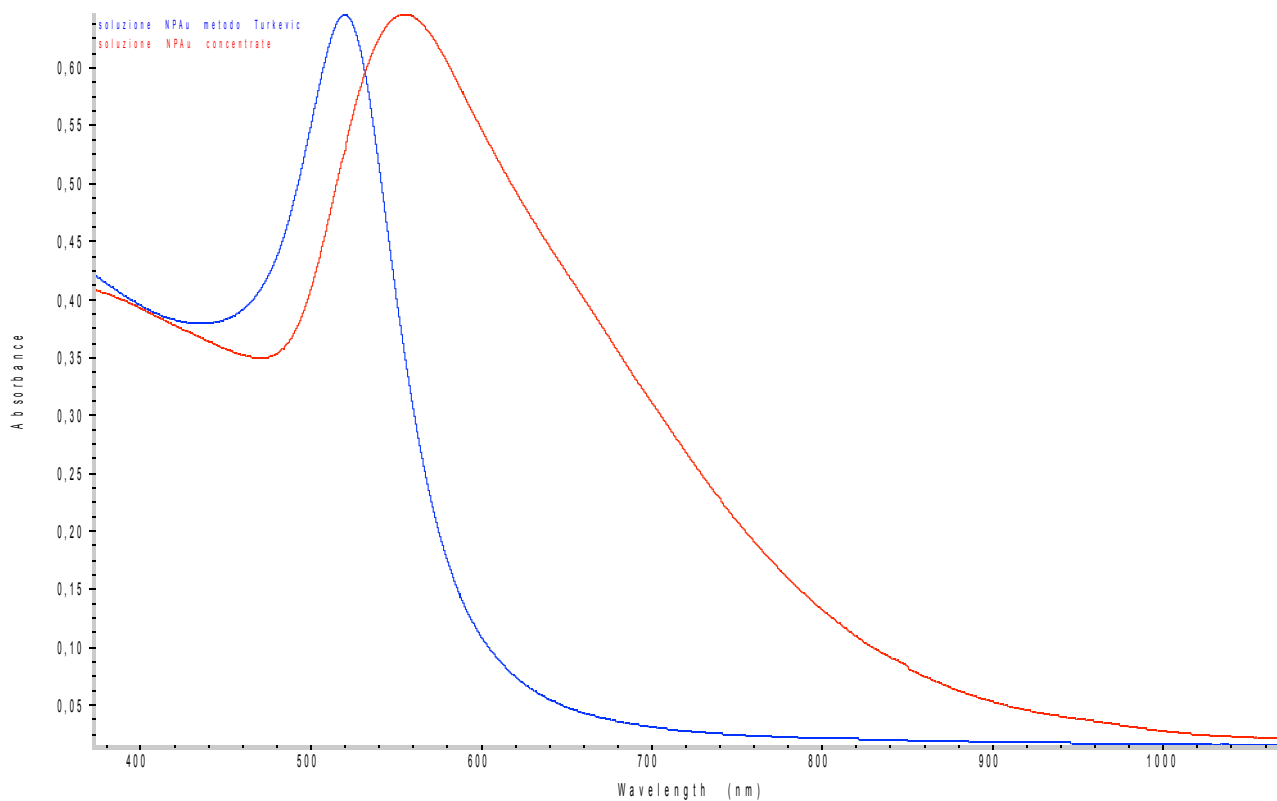


Figura 25. Confronto tra spettri di assorbimento di una soluzione colloidale ottenuta secondo il metodo Turkevich (1951) ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M) in blu, con una molto più concentrata (10^{-3} M) in rosso.

La maggiore concentrazione e dimensione delle nanoparticelle porta ad avere un colloide con maggiore scattering a differenza delle soluzioni di Turkevich (1951) (figura 26).



Figura 26. Confronto tra le colorazioni dei colloidali di oro: a sinistra quello concentrato e a destra quello ottenuto secondo il metodo di Turkevich (1951) standard.

4.3.8 Sintesi di nanoparticelle di argento concentrate con trisodio citrato e seed solution

In maniera esattamente analoga a quanto fatto per le nanoparticelle di oro, anche per quelle di argento sono stati sintetizzati dei colloidali concentrati, che presentano un picco di assorbimento plasmonico spostato a lunghezze d'onda maggiori. In particolare, prendendo come riferimento le soluzioni di Lee-Meisel (1982), in questo caso sono stati ottenuti colloidali a partire da una concentrazione sia di sale di argento che di trisodio citrato tre volte maggiore rispetto a quella usuale. Il risultato è stato un allargamento della larghezza a metà altezza del picco di assorbimento, il cui massimo si attesta a circa 436 nm, come riportato nello spettro blu di figura 27.

A questo punto, poiché si è reso necessario nel corso delle analisi Raman mostrate successivamente ricercare le migliori condizioni di risonanza plasmonica delle nanoparticelle con il laser a 457 nm, è stato necessario effettuare una “seed-solution” del colloidale concentrato al fine di spostare ulteriormente il picco fino alla lunghezza d'onda di emissione di questo laser. Aggiungendo infatti altro sale di argento e trisodio citrato alla soluzione colloidale concentrata, in quantitativo pari ad una normale soluzione Lee-Meisel (1982), e portando ancora ad ebollizione la soluzione, si è dato inizio (in modo analogo a quello che avviene nelle normali sintesi) a nuovi processi di nucleazione ma soprattutto di accrescimento. Il processo di accrescimento, in particolare, ha potuto svilupparsi per la maggior parte a partire dalle nanoparticelle già formate durante la precedente sintesi, portando ad un loro ulteriore ingrossamento.

Come risultato finale è stato possibile ottenere nanoparticelle con un picco di assorbimento plasmonico praticamente uguale alla lunghezza di emissione del laser (spettro in rosso), massimizzando in questo modo l'effetto di risonanza durante le successive analisi SERS effettuate.

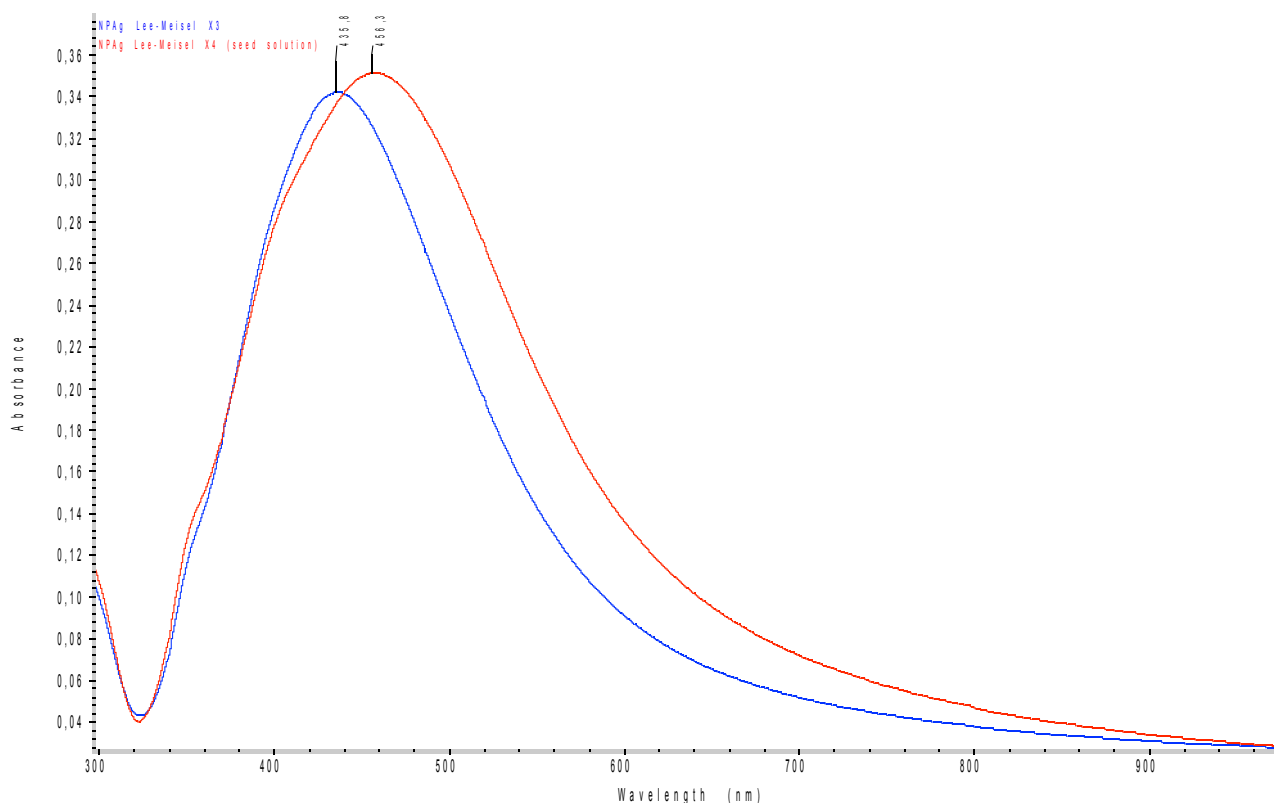


Figura 27. Nanoparticelle di argento concentrate (spettro in blu): il picco della seed-solution ottenuta da questo colloide (spettro in rosso) permette di uguagliare la lunghezza di emissione del laser (457 nm) e massimizzare quindi l'effetto di risonanza.

4.4 Centrifugazione dei colloidi^[Erriu]

4.4.1 Introduzione

Avendo ottenuto nel caso dei colloidi di argento distribuzioni molto ampie in termini di dimensioni delle nanoparticelle, si è voluto studiare la possibilità di ridurre queste distribuzioni tramite l'applicazione di uno o più step di centrifugazione. Con l'impiego di un campo centrifugo infatti si può pensare di riuscire a separare particelle dai diametri diversi, ricavando dal colloide iniziale una fase di sospensione caratterizzata dalla presenza di particelle dal diametro minore rispetto ad una fase di precipitato dove saranno presenti quasi esclusivamente nanoparticelle grosse e bastoncini dall'elevato diametro. Ai colloidi è quindi applicato un campo gravitazionale centrifugo attraverso una rotazione ad alta velocità, sfruttando la differenza di densità tra le particelle ed il mezzo in cui sono disperse.

* Per la stesura del paragrafo 4.4 si rimanda ai seguenti indirizzi web:
http://busto.dipbsf.uninsubria.it/cns/fasano/Edu/metbioc/2_Centrifugazione.ppt
<http://www-3.unipv.it/scienzemotorie/public/3619empamfrtransportobis.pdf>

Dalla meccanica classica il campo centrifugo ha un'espressione del tipo:

$$G = \omega^2 \cdot r \quad (1)$$

dove r è la distanza dall'asse di rotazione e ω la velocità angolare, espressa in radianti·s⁻¹. Per esprimere la velocità di rotazione in giri al minuto (RPM) vale la relazione:

$$\omega = \frac{2 \cdot \pi \cdot \text{RPM}}{60} \quad (2)$$

Il campo centrifugo G è quindi esprimibile come:

$$G = \frac{4 \cdot \pi^2 \cdot \text{RPM}^2}{3600} \cdot r \quad (3)$$

Per analizzare il fenomeno della centrifugazione consideriamo ora una provetta cilindrica riempita con il colloide sotto l'azione di una forza centrifuga. Le forze in gioco all'interno del sistema sono riportate in figura 28.

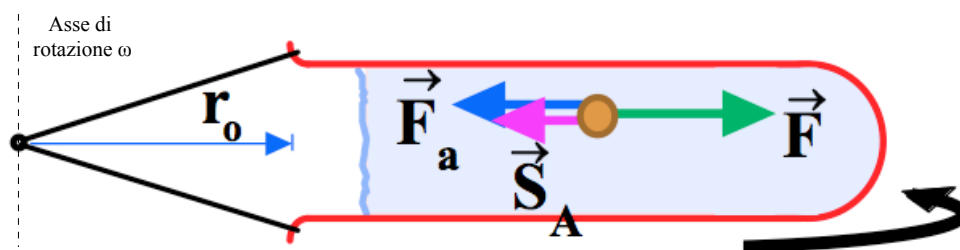


Figura 28. Forze agenti su una generica nanoparticella in soluzione acquosa durante il processo di centrifugazione attorno all'asse di rotazione. La coordinata presa come riferimento è quella radiale r .

Considerando la forza peso trascurabile si ha che la forza centrifuga $F = m \cdot \omega^2 \cdot r$ agisce in direzione opposta alla forza viscosa di frenamento $F_a = f \cdot v$ e alla spinta di Archimede $S_a = m' \cdot \omega^2 \cdot r$, dove con m e m' si indicano rispettivamente le masse della particella e del fluido spostato, v rappresenta la velocità con cui si muove la particella verso il fondo e f è un coefficiente che per una particella sferica è uguale a $6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot a$, con η viscosità del mezzo e a raggio della particella.

L'instaurarsi di un equilibrio dinamico porta ad avere un bilanciamento vettoriale delle forze in gioco:

$$\vec{F} + \vec{F}_a + \vec{S}_a = 0 \quad (4)$$

Considerando ora le masse come il prodotto tra la densità e il volume e utilizzando l'espressione di f per particelle sferiche, è possibile esplicitare dalla (4) l'espressione per la velocità di sedimentazione della particelle che risulta essere:

$$v_s = \frac{2}{9} \frac{a^2 \cdot (\rho_p - \rho_m)}{\eta} \omega^2 \cdot r \quad (5)$$

dove con ρ_p e ρ_m si indicano le densità della particelle e del mezzo. Dalla (5) si nota che se la differenza di densità tra particella e mezzo è uguale a 0 allora è impossibile avere sedimentazione delle particelle sul fondo per qualsiasi campo centrifugo G applicato.

Il tempo di sedimentazione per una particella al pelo libero si ottiene considerando ($v_s = dr/dt$) e integrando la (5) tra due raggi misurati rispetto all'asse di rotazione, che in questo caso sono quello al pelo libero della soluzione e quello del fondo della provetta:

$$t_s = \frac{9}{2} \frac{\eta}{[\omega^2 \cdot a^2 \cdot (\rho_p - \rho_m)]} \cdot \ln\left(\frac{r_{\max}}{r_{\min}}\right) \quad (6)$$

Per un dato t_s di sedimentazione quindi la soluzione colloidale inizialmente torbida assume un gradiente di concentrazione che aumenta andando verso il fondo della provetta, dove il campo centrifugo è maggiore. Poiché esiste una relazione di proporzionalità quadrata inversa tra il tempo di sedimentazione t_s e il raggio della particella a si può intuire facilmente come le particelle più grandi avranno tempi di sedimentazione minori rispetto a quelle più piccole.

Il processo complessivo di centrifugazione è quindi schematizzabile come mostrato in figura 29.

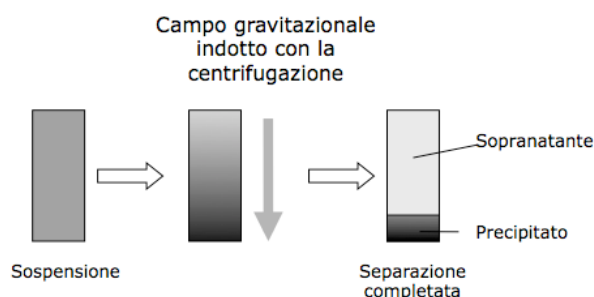


Figura 29. Partendo da un colloide, tramite l'applicazione di un campo gravitazionale indotto dalla centrifugazione, è possibile ottenere una separazione di fase tra precipitato torbido e sopranatante di aspetto invece limpido.

Per poter meglio interpretare i risultati ottenuti dalle prove sperimentali mostrati in seguito, è opportuno introdurre prima un modello semplificato per descrivere il comportamento delle particelle in soluzione durante la centrifugazione. Successivamente le indicazioni fornite da questa simulazione saranno confrontate con gli spettri di assorbimento dei colloidi centrifugati.

4.4.2 Modello di centrifugazione per colloidi di argento

Con riferimento alla figura 30, per simulare il comportamento delle nanoparticelle in soluzione si è schematizzata la provetta come un contenitore cilindrico con all'interno 10000 particelle distribuite in maniera random. Si è definita r la coordinata radiale e, con riferimento alla (6), r_{\min} e r_{\max} sono stati assunti uguali rispettivamente a 3 e 10 cm, sulla base delle provette disponibili nell'apparato di centrifugazione utilizzato in questo lavoro di tesi.

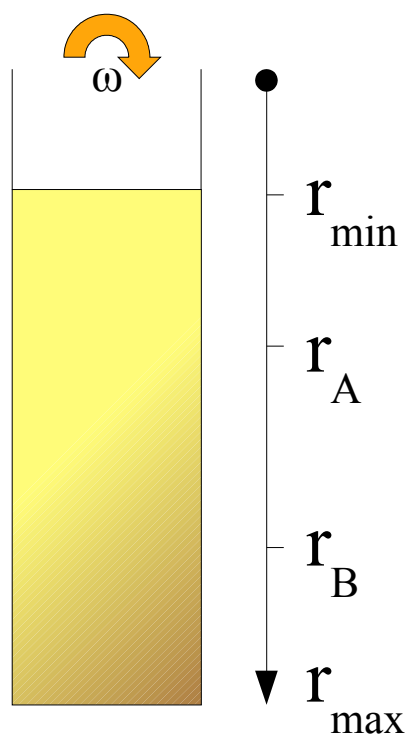


Figura 30. Provetta con all'interno il colloide durante centrifugazione: con la sfumatura si indica il processo di sedimentazione delle particelle più grosse e dei bastoncini verso il fondo.

Sempre dalla formula (6) il tempo che impiega una particella per andare da due generiche posizioni r_A a r_B è esprimibile allora come una funzione parametrica in k :

$$t_{(A \rightarrow B)} = k \cdot \ln\left(\frac{r_B}{r_A}\right) \quad (7) \quad \text{con} \quad k = \frac{9}{2} \frac{\eta}{[\omega^2 \cdot a^2 \cdot (\rho_p - \rho_m)]} \quad (8)$$

Risulta ovvio che il tempo di sedimentazione per ogni particella che si trova a qualsiasi altezza della provetta non potrà in alcun caso essere maggiore di t_s calcolato tra r_{\min} e r_{\max} che sono i due valori estremi del sistema. Per valori di tempo maggiori o uguali a t_s tutte le nanoparticelle si trovano sul fondo. Visto che per le provette utilizzate $\ln(10/3) = 1,2$ il parametro k fornisce direttamente l'ordine di grandezza del tempo di sedimentazione per una data dimensione di nanoparticelle e velocità di rotazione.

Considerando ora la (8) si è voluto valutare l'andamento del diametro delle particelle che precipitano in funzione del parametro k per vari valori di RPM impiegabili con i rotori delle centrifughe a disposizione (figura 31). La viscosità è stata per semplicità assunta uguale a quella dell'acqua ($1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$), mentre per le densità si sono presi i valori dell'argento e dell'acqua pura ($10,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ e $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ rispettivamente).

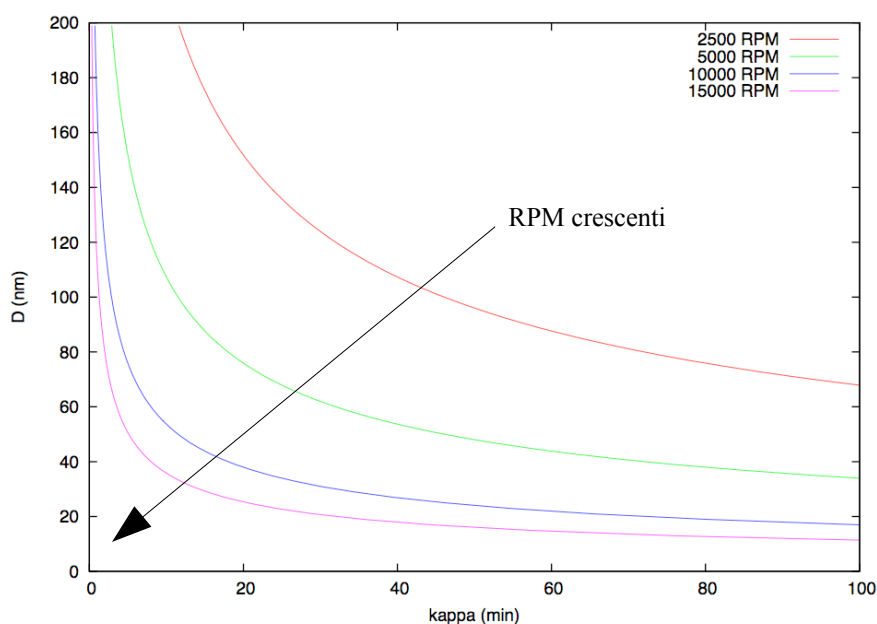


Figura 31. Diametri D delle particelle che precipitano in funzione del parametro temporale k (kappa), espresso in minuti. Gli andamenti sono stati calcolati per vari valori di RPM.

Dalla figura si osserva che, per distribuzioni tipiche dei colloidi di argento sintetizzati con trisodio citrato, i tempi per la completa sedimentazione di tutte le particelle sul fondo possono superare i 60 minuti centrifugando a 15000 RPM (si assume in questo caso un diametro minimo delle particelle pari a 20 nm). Naturalmente in questa descrizione teorica non si è tenuto conto della possibile interazione fra particelle durante la centrifugazione, non ritenendo necessario per i casi studiati avere un modello eccessivamente dettagliato e complesso. Questo grafico risulta comunque utile per avere una stima di massima dei minuti che occorrono per arrivare ad una completa

sedimentazione del colloide.

Per effettuare le simulazioni si è deciso quindi di prendere come riferimento il tempo caratteristico k e di studiare la cinetica del fenomeno di sedimentazione in funzione di questo parametro. Nella figura 32 si riporta una simulazione che descrive come nanoparticelle di un unico raggio (20 nm) sedimentino sul fondo all'aumentare del tempo τ , espresso come frazione di k .

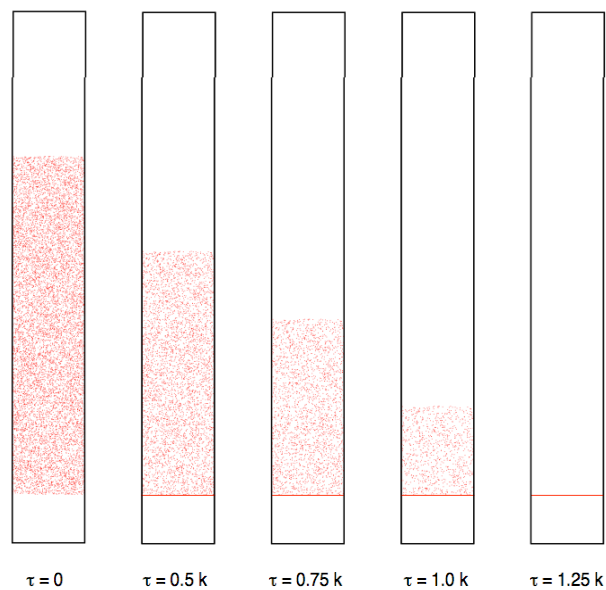


Figura 32. Partendo dal tempo $\tau = 0$ con una distribuzione di particelle completamente casuale all'interno della provetta, all'aumentare di esso si assiste parallelamente ad uno spostamento complessivo verso il basso e a una rarefazione delle particelle nella provetta. Per un tempo $\tau = 1,25 k$ si ha completa sedimentazione.

Effettuando ora una simulazione simile alla precedente ma con 3 diametri diversi (figura 33) si può apprezzare come le particelle subiscano il campo centrifugo in maniera direttamente dipendente dal loro diametro. Le particelle più grandi e quindi più pesanti sono spinte verso il fondo più velocemente di quelle piccole. Da queste analisi teoriche si può pensare di riuscire a separare quindi a livello sperimentale distribuzioni di diametri volute, a partire dalla distribuzione di partenza che come si è visto nei paragrafi precedenti è piuttosto ampia.

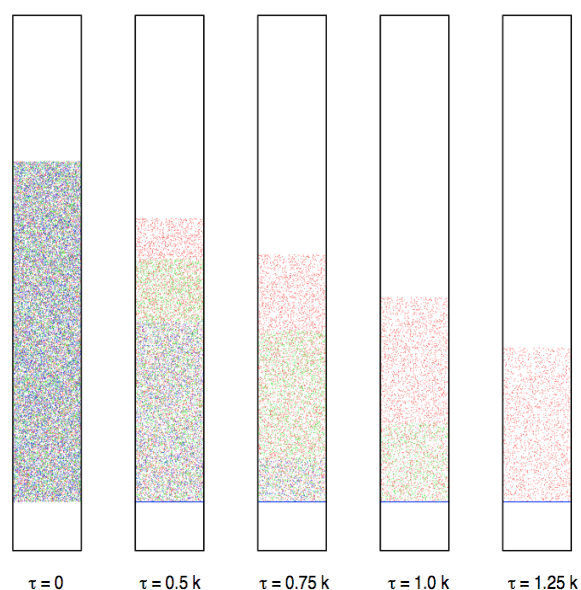


Figura 33. Particelle da 20 (rosse), 25 (verdi) e 30 (blu) nm di diametro subiscono differenti campi centrifughi: partendo tutte da una distribuzione casuale all'interno della provetta per $\tau = 0$ le particelle blu sono completamente sul fondo già per $\tau = k$. Per $\tau = 1,25 k$ invece rimangono in soluzione solo quelle da 20 nm.

4.4.3 Centrifugazione dei colloidali di argento

Per quanto riguarda la parte sperimentale la centrifuga utilizzata per le centrifugazioni è la Hettich EBA 21, riportata in figura 34.



Figura 34. Centrifuga da banco Hettich EBA 21 utilizzata per la centrifugazione dei colloidali.

Questa centrifuga lavora sia con rotori ad angolo fisso che con quelli swing-out i quali in fase di centrifuga portano l'angolo tra provetta e rotore a 90° (figura 35). Nella prove sperimentali sono stati utilizzati entrambi i tipi di rotori per la separazione delle nanoparticelle. Mentre il rotore swing-out permette da una parte di avere una maggiore differenza tra i valori di r_{\min} e r_{\max} tuttavia esso può operare fino ad un massimo di 5000 RPM. Tale valore massimo non si è mostrato sufficiente per ottenere buone separazioni e risultati soddisfacenti. Per questo motivo si è ricorsi al

rotore ad angolo fisso utilizzabile fino a 18000 RPM, il quale inoltre ha permesso di diminuire di gran lunga i tempi operativi di centrifugazione.

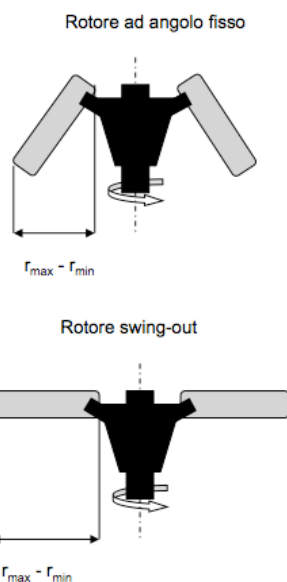


Figura 35. Il rotore a swing-out durante la fase di centrifugazione porta la provetta a 90° rispetto all'albero del rotore a differenza di quella ad angolo fisso.

In figura 36 si riportano 3 spettri della soluzione 2 (cfr. tabella 2, paragrafo 4.3.2) ottenuti dopo aver separato e analizzato altrettanti precipitati a 5000 RPM per 15 minuti. Questi precipitati sono stati riportati ai volumi di partenza con acqua e citrato nelle concentrazioni tipiche della soluzione Lee-Meisel (1982). A questo punto è stato di nuovo applicato uno step di centrifugazione alle soluzioni con 3 tempi operativi differenti (5, 10 e 13 minuti) ed è stata analizzata questa volta la fase sopranatante. Dal grafico si nota che passando da 5 a 13 minuti di centrifugazione le particelle che rimangono nella fase sopranatante hanno diametri medi minori in quanto il picco plasmonico si sposta a lunghezze d'onda minori, come indicato dalla freccia. Ciò è dovuto al fatto che all'aumentare del tempo di centrifugazione (a parità di RPM), una maggiore quantità di nanoparticelle andranno sul fondo a partire da quelle più grosse fino ad arrivare progressivamente a quelle di diametri minori.

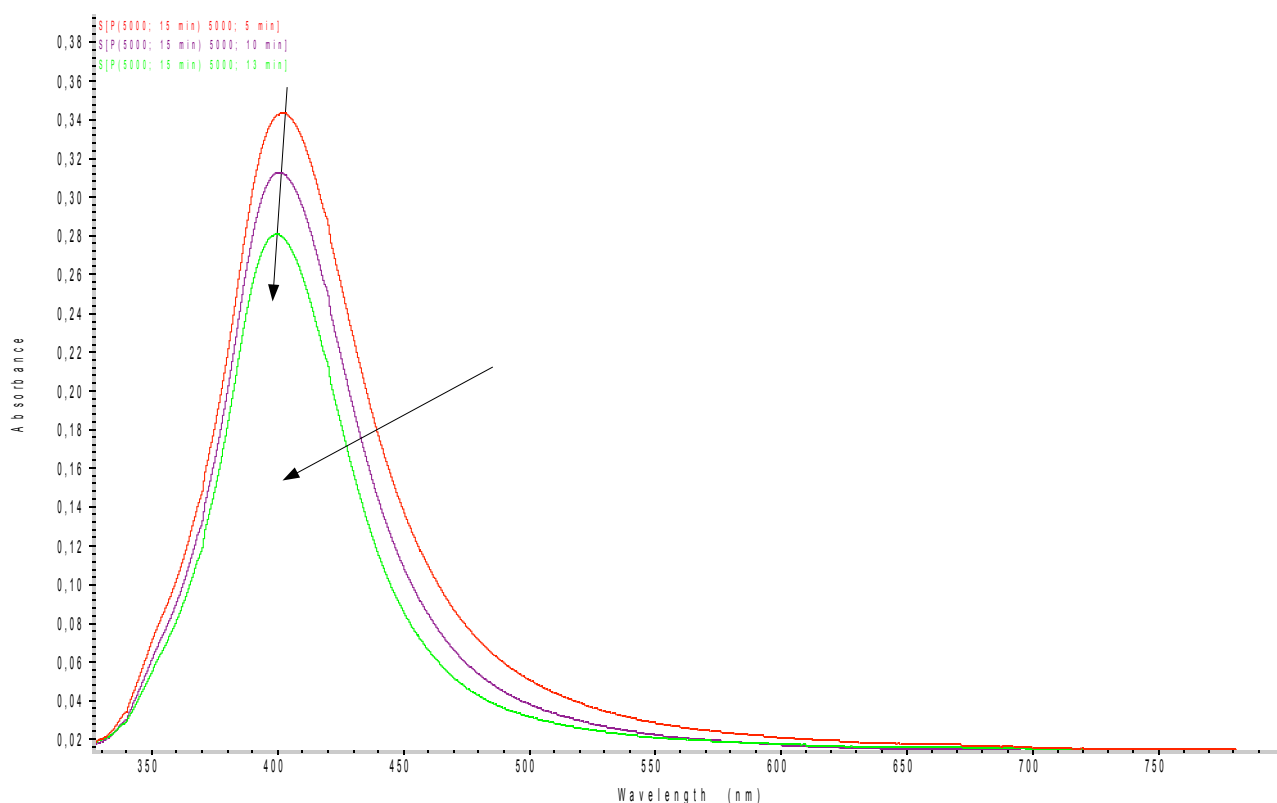


Figura 36. Analizzando le tre fasi sopranatanti si ottengono colloidi con diametri medi sempre minori (λ_{picco} minori) e con distribuzioni più strette, come testimoniato dalla riduzione progressiva della larghezza a metà altezza dei picchi di assorbimento relativi.

È quindi possibile modulare con buona precisione la frazione di nanoparticelle ottenute applicando in pratica un “filtro” alla distribuzione dei diametri, come è dimostrato dalla riduzione sensibile della larghezza a metà altezza del picco di assorbimento all'aumentare del tempo di centrifuga. Una trattazione più approfondita sul concetto di filtro di una distribuzione è stato fatto con riferimento alla figura 37.

Modulando i parametri operativi nel processo di centrifugazione, vale a dire il tempo operativo e il numero di RPM impiegati, è quindi possibile separare delle frazioni ben precise dalla distribuzione dei diametri che formano il colloide di partenza. Ciò è esemplificato dalla figura 37 dove, partendo dalla soluzione non centrifugata (in rosso) è stato possibile frazionare la distribuzione di partenza in componenti caratterizzate dalla presenza di diametri piccoli (azzurro), intermedi (verde) ed elevati (blu) delle particelle. In questa figura la disposizione degli spettri che indicano la presenza di diametri definiti al di sotto di quella in rosso sta ad indicare proprio il fatto che queste nanoparticelle sono una frazione della distribuzione iniziale. Ovviamente una loro miscelazione porterebbe ancora nelle condizioni di ottenere la distribuzione di partenza.

È utile osservare che, a testimonianza dell'effettiva separazione dei diametri applicata, ci sono

separazioni significative fra i picchi plasmonici delle varie soluzioni, con shift di addirittura 30 nm tra lo spettro in azzurro (394 nm) e quello in blu (424 nm).

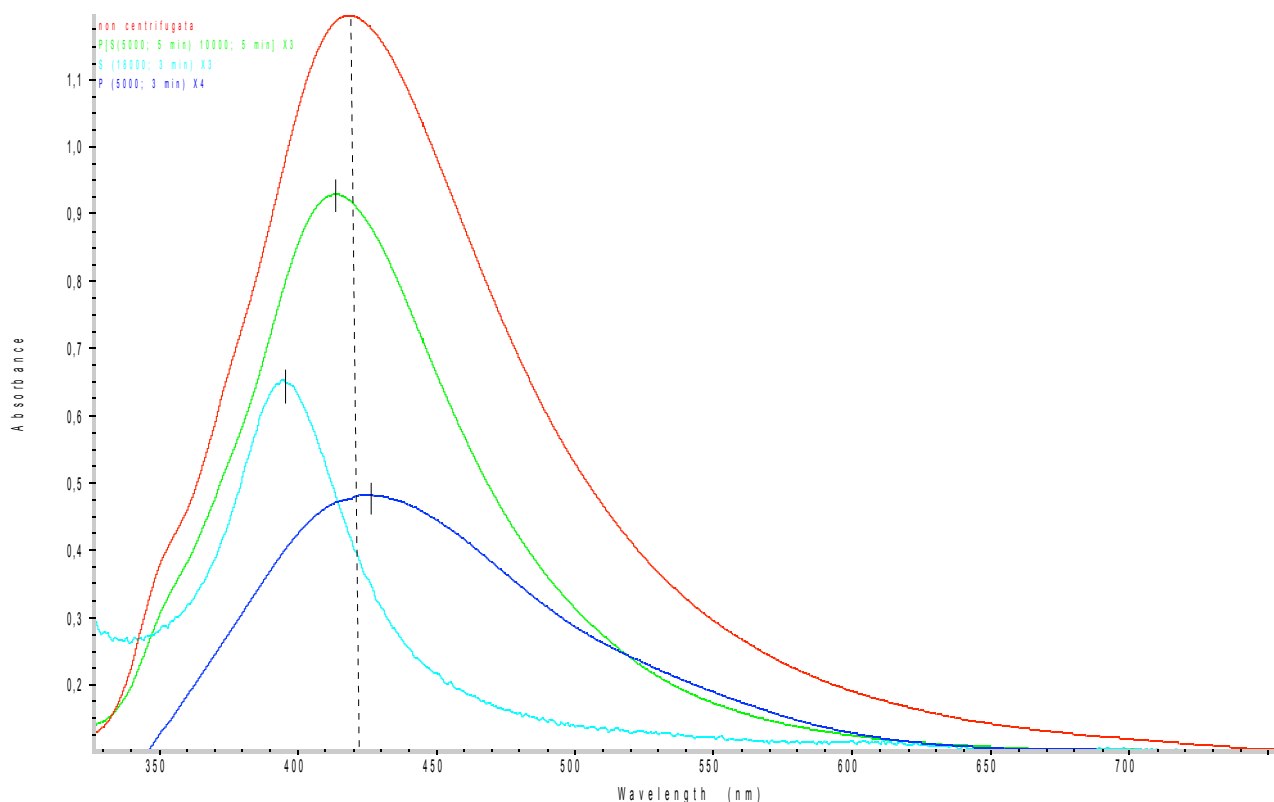


Figura 37. Frazioni della distribuzione dei diametri del colloide di partenza (in rosso). Gli spettri in azzurro, verde e blu indicano rispettivamente colloidii contenenti particelle piccole, medie e grosse.

Per meglio illustrare l'azione della centrifugazione sul colloide e il concetto di “filtro” applicato alla distribuzione iniziale, si è considerato opportuno introdurre un grafico qualitativo che mostra una funzione discontinua Φ , passante da 1 a 0 in un dato punto. Tale grafico riporta sull'asse delle ascisse il diametro medio D in nanometri o il tempo di centrifugazione t in minuti, mentre su quello delle ordinate il valore della funzione Φ . Per un dato colloide questa funzione rappresenta la presenza ($\Phi = 1$) o meno ($\Phi = 0$) di un numero significativo di nanoparticelle per un dato diametro D .

Il grafico di figura 38 vuole rappresentare schematicamente l'azione del filtro applicata al colloide di partenza, la cui distribuzione è indicata dalla linea continua in grassetto, al fine di ottenere lo spettro in azzurro della figura 37. La distribuzione complessiva infatti arriva ad un certo diametro massimo delle particelle, oltre il quale la funzione va a 0. Da qui mediante centrifugazione, applicando il cosiddetto filtro, definiamo una separazione tra la sospensione S , che contiene diametri minori, e il precipitato P contenente particelle grosse e bastoncini. La parte analizzata è

quella tratteggiata, ottenuta prelevando la sospensione dopo una centrifugazione di 3 minuti a 18000 RPM. Dal grafico si evidenzia in maniera evidente quindi che il colloide analizzato è una frazione della distribuzione di partenza, in quanto la nuova funzione, sempre partendo dall'unità, interseca prima il punto zero dell'asse delle ascisse, lasciando i diametri a destra di essa nella fase di precipitato.

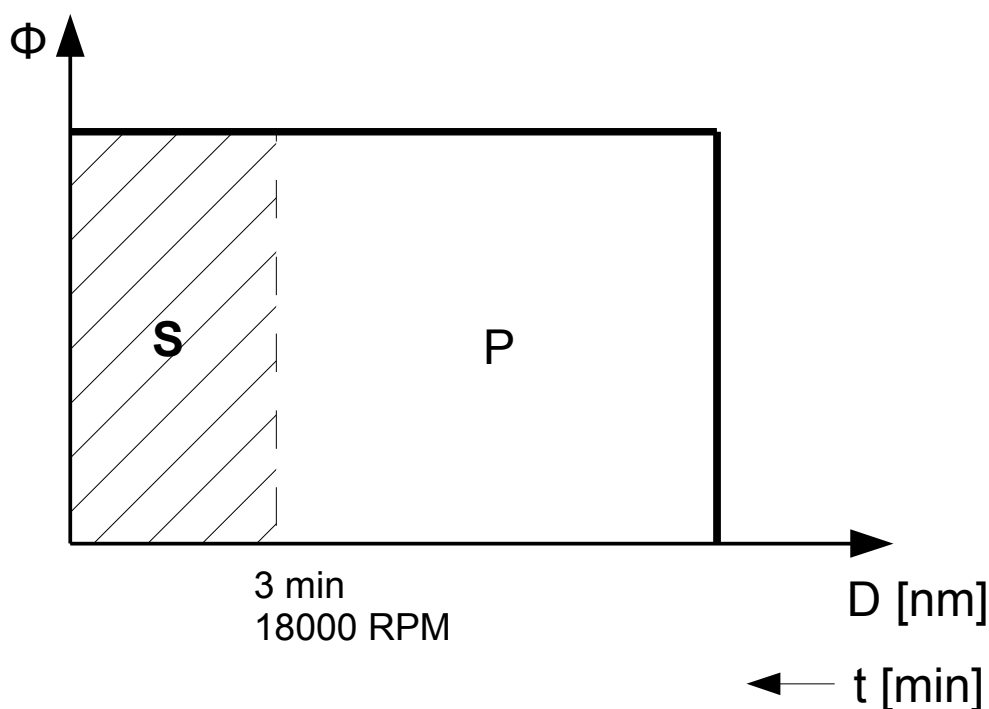


Figura 38. Grafico relativo allo spettro in azzurro della figura 37. L'azione del filtro in questo caso è volta ad ottenere un colloide caratterizzato da diametri molto piccoli e con una distribuzione stretta. All'aumentare del tempo t di centrifugazione si riducono i diametri presenti nella sospensione S , portando la linea tratteggiata sempre più a sinistra nel grafico. La linea in grassetto mostra la funzione Φ del colloide iniziale.

Occorre notare che l'azione del filtro diventa via via più efficace all'aumentare delle numero di iterazioni effettuate. Dopo aver separato la sospensione con una centrifugazione a 3 minuti e 18000 RPM, il colloide è stato riportato al volume iniziale con aggiunta di acqua e citrato per evitare una possibile aggregazione delle nanoparticelle. A questo punto la centrifugazione è stata ripetuta ancora 2 volte esattamente con gli stessi parametri di prima, utilizzando sempre acqua e citrato dopo la separazione fra le due fasi per riportarsi al volume di partenza. Queste iterazioni sono naturalmente volte a rendere più efficace il filtro e a ridurre l'inevitabile errore sperimentale che si genera durante la separazione tra sospensione e precipitato. Si è notato infatti che, prelevando la sospensione, un certo numero di particelle grosse del precipitato si spostano comunque in questa fase: ciò è dovuto al fatto che durante l'aspirazione si produce inevitabilmente un piccolo rimescolamento tra le due fasi.

D'altra parte all'aumentare delle iterazioni, mantenendo tutti i parametri uguali, si nota che le sospensioni sono sempre meno scatteranti a dimostrazione del fatto che si ha una progressiva eliminazione delle particelle più grosse. In altre parole è come se si applicassero più filtri in serie al colloide all'aumentare del numero di iterazioni, rendendo in questo modo sempre meno probabile la presenza all'interno della sospensione di diametri a destra della linea tratteggiata.

Nella figura 39 si riporta il grafico che schematizza il filtro applicato alla soluzione di partenza per ottenere lo spettro in blu di figura 37. Facendo un confronto con il grafico di figura 38, si opera con lo stesso tempo di centrifugazione ma con valori di RPM decisamente minori (5000): la frazione di precipitato sarà nettamente minore rispetto a quella di prima in quanto un minore numero di nanoparticelle precipitano sul fondo. Queste saranno caratterizzate da grossi diametri e bastoncelli. È quindi ragionevole ipotizzare di tagliare la distribuzione di partenza in un punto che sta nettamente più a destra rispetto al filtro precedente.

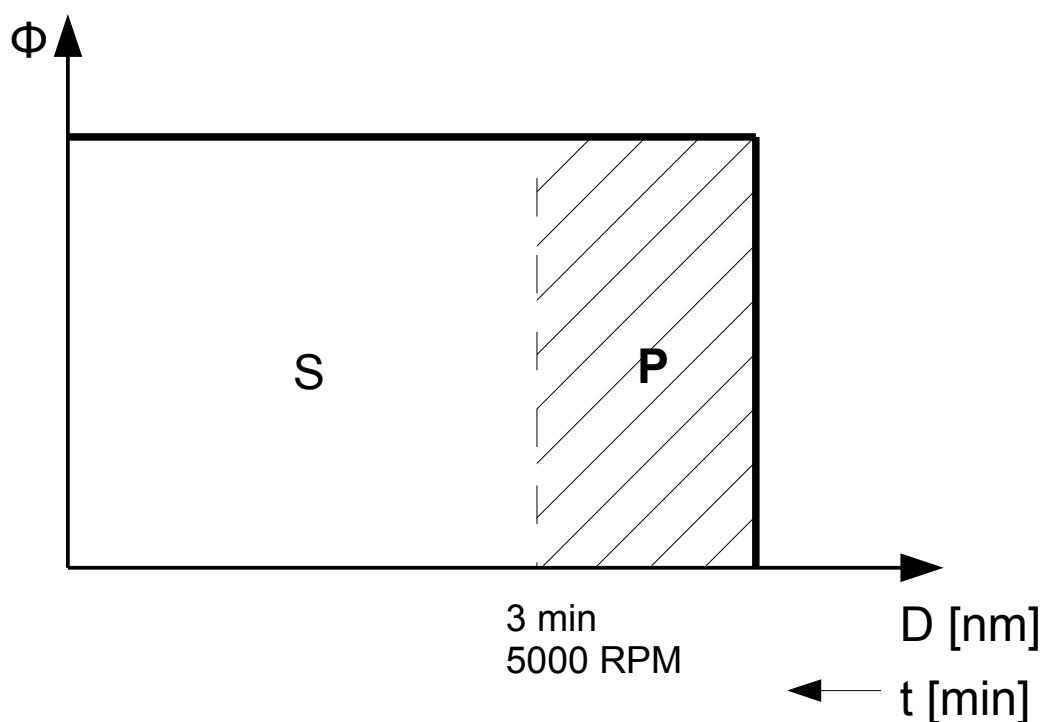


Figura 39. Grafico relativo allo spettro in blu della figura 37. L'azione del filtro in questo caso è volta ad ottenere un colloide caratterizzato da particelle grosse e bastoncelli.

Anche in questo caso è stato necessario effettuare delle iterazioni, per la precisione 4, in modo esattamente simile a quanto descritto in precedenza, al fine di rendere la separazione sempre meglio definita e ottenere un precipitato con solamente particelle grosse e bastoncelli al suo interno.

Per quanto riguarda invece lo spettro in verde esso è rappresentativo delle particelle con diametri intermedi, ed è stato ottenuto attraverso l'applicazione di un filtro doppio, il quale ha permesso di

tagliare sia a destra che a sinistra le code della distribuzione complessiva. Non deve quindi sorprendere il fatto che lo spettro in verde abbia un picco (414 nm) che si discosta poco da quello dello spettro in rosso (419 nm), ma che soprattutto presenti una larghezza a metà altezza sensibilmente ridotta, in quanto è stato eliminato il contributo sia delle particelle piccole a sinistra che quello delle particelle grosse e dei bastoncelli a destra, portando il picco plasmonico dello spettro in verde ad essere completamente sotteso da quello dello spettro in rosso. Partendo quindi sempre dalla distribuzione iniziale schematizzata dalla linea in grassetto di figura 40, si è applicato un primo step di centrifugazione al colloide della durata di 5 minuti a 5000 RPM. Prelevando ora il soprannatante si è eliminata la parte a destra della linea rossa, indicata con P (precipitato).

Successivamente la soluzione è stata riportata a volume iniziale con acqua e citrato, ed è stata sottoposta ad un secondo filtro operando sempre con una centrifugazione di 5 minuti ma a 10000 RPM. Partendo quindi dopo la prima centrifugazione da una distribuzione complessiva delimitata dai diametri a sinistra della linea rossa, con il secondo step si è operato una separazione ulteriore all'interno di questa distribuzione, come indicato dalla linea blu.

Si ricava quindi da questa nuova separazione una fase S di sospensione e una fase P(S) che indica il precipitato, derivante da una fase precedente di sospensione (S). La fase P(S) analizzata è quella tratteggiata nel grafico ed è rappresentata dallo spettro in verde della figura 37: come nei casi precedenti si è presentata la necessità di iterare il secondo step di centrifugazione 3 volte.

È possibile inoltre dimostrare che operando in maniera esattamente speculare a prima, cioè scambiando i due step di centrifugazione e mantenendo i parametri operativi di tempo e RPM esattamente uguali si ottiene una fase S(P) che presenta spettri di assorbimento e quindi distribuzione di diametri identica a P(S).

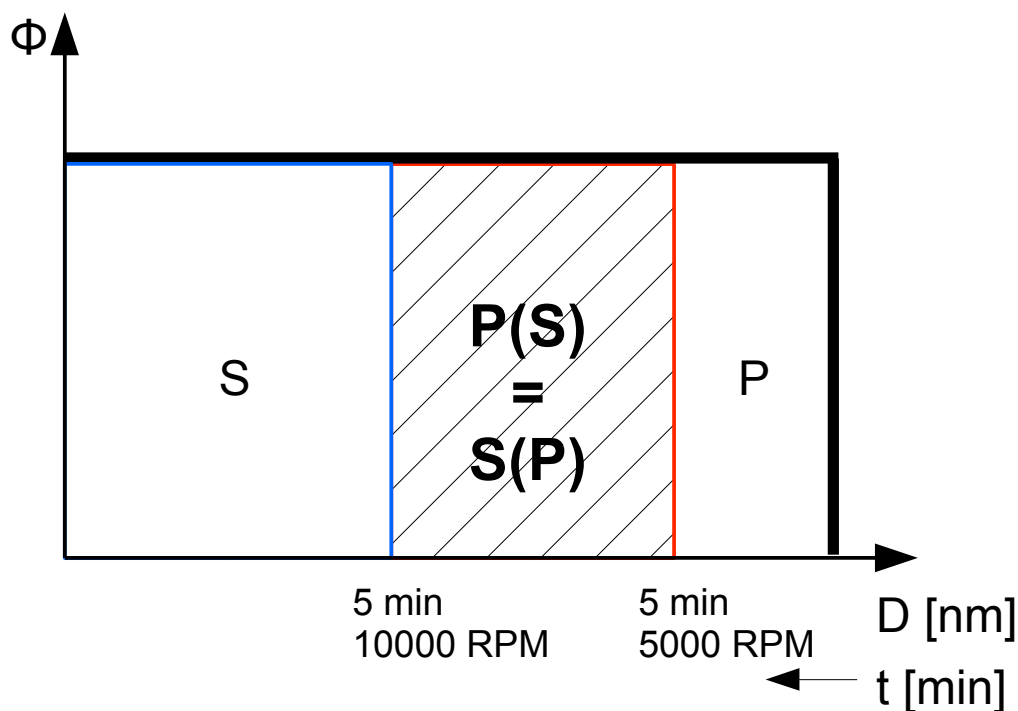


Figura 40. Grafico relativo allo spettro in verde della figura 37. L'applicazione di un filtro incrociato permette di tagliare le code della distribuzione, ricavando una fase P(S) caratterizzata da particelle con dimensione e distribuzione uguale a una fase S(P) ottenibile agendo in maniera speculare.

Avendo già sottolineato l'importanza dell'iterare i passaggi di centrifugazione per ottenere separazioni dei diametri sempre meglio definite si mostra in figura 41 un dato sperimentale esemplificativo. In questa figura oltre agli spettri in rosso e in azzurro di figura 37 si aggiunge quello in verde ricavato con gli stessi parametri e procedure di quello in azzurro ma con una sola iterazione. L'impiego di una sola iterazione non permette di ottenere distribuzioni di diametri soddisfacenti in quanto il picco è nettamente più a destra dello spettro in azzurro e la larghezza a metà altezza è maggiore. Ciò indica che il colloide contiene ancora particelle dai diametri piuttosto elevati, in grado di dare un contributo al picco plasmonico in modo tale da spostarlo a lunghezze d'onda maggiori; viceversa all'aumentare delle iterazioni questo contributo viene progressivamente eliminato, come testimoniato dallo spettro in azzurro.

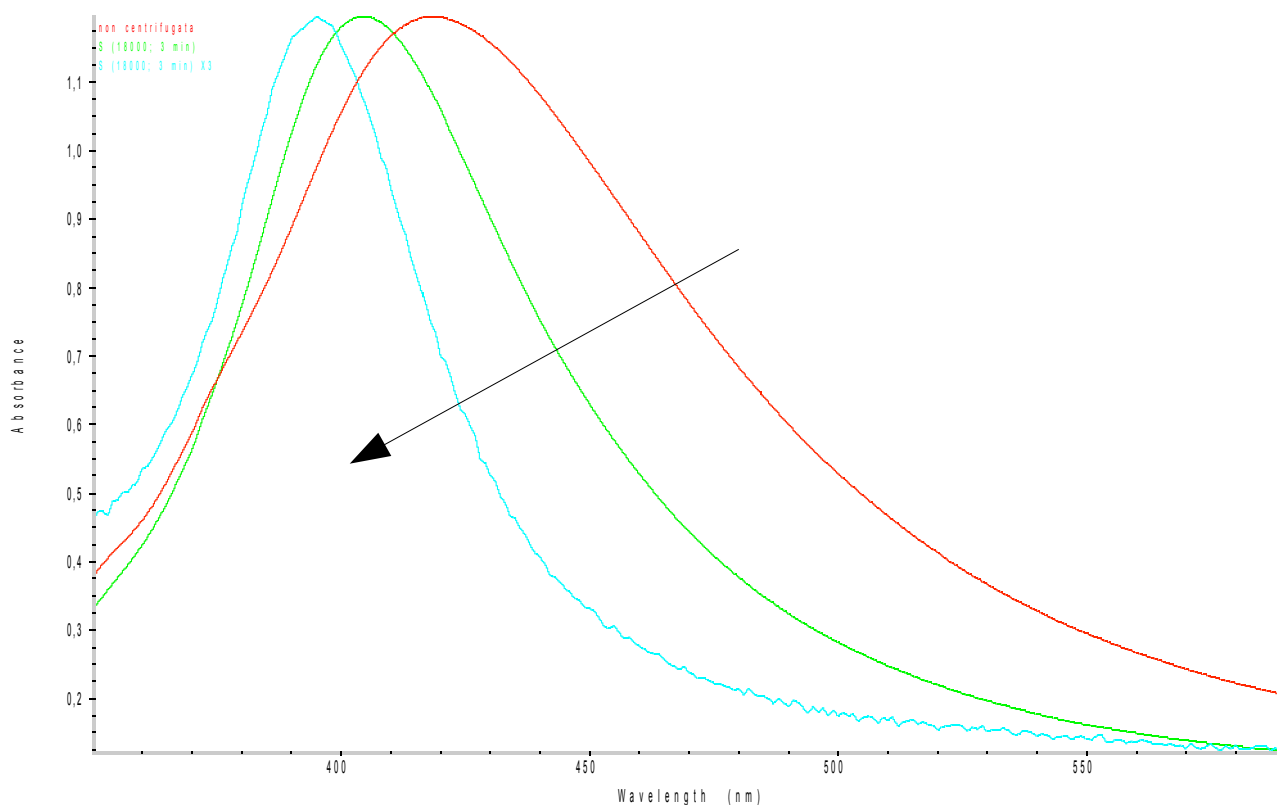


Figura 41. Spettri di assorbimento registrati passando da una (spettro in verde) a 3 iterazioni (spettro in azzurro), mantenendo i parametri operativi invariati. La freccia indica la diminuzione della larghezza a metà altezza all'aumentare delle iterazioni e lo spostamento del picco di assorbimento.

Nella fotografia di figura 42 si riporta l'aspetto dei colloidi i cui spettri sono stati mostrati in figura 41. Il colloide a sinistra (spettro azzurro) avendo subito 3 iterazioni è più limpido e meno scatterante dell'omologo ottenuto con una iterazione sola (spettro verde), rappresentato dal colloide al centro, poiché sono state eliminate in maggiore quantità le particelle grosse e i bastoncelli.

Il colloide al centro presenta infatti un aspetto più torbido, che si riflette in figura 41 in una larghezza a metà altezza maggiore e in un picco a lunghezze d'onda più elevate; a destra è mostrato invece il colloide di partenza (spettro in rosso).



Figura 42. Da sinistra a destra sono mostrati i colloidi i cui spettri sono rispettivamente quello azzurro, verde e rosso della figura 41.

Per quanto riguarda invece la centrifugazione dei colloidi di oro, essa non ha dato risultati soddisfacenti a causa delle strettissime distribuzioni dei diametri che si ottengono utilizzando il metodo di sintesi di Turkevich (1951). In questo articolo infatti si mostra che la distribuzione dalla sintesi è caratterizzata da nanoparticelle con diametro di $(20 \pm 1,5)$ nm, con una deviazione standard del 12,5%. Data la distribuzione stretta che si crea è praticamente impossibile separare con i parametri operativi a disposizione frazioni precise dei colloidi di partenza. Non a caso l'importanza del metodo di Turkevich (1951) sta proprio nella alta riproducibilità che caratterizza questi colloidi.

Le prove effettuate anche con RPM elevati non sono state in grado di produrre apprezzabili variazioni negli spettri né delle larghezze a metà altezza né tantomeno della posizione del picco di assorbimento. L'unico risultato ottenuto dopo la fase di centrifuga è stato solamente quello di produrre una minore concentrazione delle particelle nella fase di sospensione, che però come detto non fornisce spettri diversi da quelli di partenza.

4.5 Immobilizzazione di nanoparticelle su substrati vetrosi

I colloidi di oro e argento, oltre a dare la possibilità di sviluppare l'effetto SERS in sospensione colloidale, possono essere utilizzati per ottenere substrati solidi attraverso un processo di funzionalizzazione del substrato stesso. Nel corso degli ultimi anni questa possibilità ha dato origine a una serie di metodi di immobilizzazione che si differenziano sia per la superficie su cui avviene l'immobilizzazione che per l'agente immobilizzante usato per formare lo strato metallico [Grabar (1995), Grabar (1996), Jal (2003)].

L'ottenimento di un substrato solido permette infatti di fare adsorbire in particolari condizioni molecole di analita sullo strato metallico attraverso la formazione di veri e propri legami chimici,

rendendo in questo modo la superficie stabile nel tempo e non soggetta a fenomeni di aggregazione e sedimentazione come nel caso della fase acquosa, dove esiste una finestra temporale ottimale su cui eseguire la misura SERS (*cf.* paragrafo 5.5).

Durante il lavoro di tesi si è scelto quindi di immobilizzare le nanoparticelle sintetizzate precedentemente su substrati di vetro, avvalendosi di due degli agenti immobilizzanti più noti: il 3-(aminopropyl)trimetoxysilane (APTMS) e il 3-(mercaptopropyl)trimetoxysilane (MPTMS). Il processo di silanizzazione del vetro e di immobilizzazione delle nanoparticelle seguito è equivalente sia per l'APTMS che per l'MPTMS ed è riassumibile nei seguenti passaggi [*Pesapane (2005)*]:

1. Immersione del vetrino in metanolo o etanolo e HCl in rapporto 1:1 per 20 minuti
2. Lavaggio con acqua demineralizzata
3. Immersione per 15 minuti in una soluzione contenente 3 parti di H₂SO₄ e 1 parte di H₂O₂ al 30%
4. Lavaggio con acqua demineralizzata
5. Ulteriore lavaggio con metanolo
6. Immersione del vetrino in soluzione (20% in volume) di APTMS (MPTMS) in etanolo per 24 ore
7. Estrazione del vetrino e lavaggio abbondante con etanolo.
8. Il vetrino è fatto asciugare per 1 ora a 80°C prima di essere nuovamente lavato con etanolo e acqua distillata
9. Immersione del vetrino nella soluzione colloidale di nanoparticelle

Nel procedimento rivestono grande importanza le fasi di lavaggio intermedie fra uno step e l'altro del processo di immobilizzazione. I residui degli agenti immobilizzanti infatti influenzano il risultato finale: la loro presenza facilita l'aggregazione delle particelle e porta alla formazione di multilayer caratterizzati dalla presenza di aggregati.

In figura 43 si riporta una schematizzazione di questo processo di immobilizzazione nel caso di nanoparticelle di argento immobilizzate ad opera dell'APTMS. Il processo è analogo nel caso dell'MPTMS, che però attraverso il suo gruppo funzionale -SH permette l'instaurarsi di un legame di carattere covalente con la nanoparticella (figura 44).

Durante l'immobilizzazione l'APTMS si trova ad interagire con i gruppi -OH della superficie vetrosa: ciò porta alla formazione di un legame covalente tra molecola e vetro con la formazione di metanolo. Al termine di questo step la superficie vetrosa si trova ricoperta di molecole di APTMS che espongono in fase liquida il gruppo carico -NH₃⁺ in opportune condizioni di pH. Dopo gli

accurati risciacqui necessari per eliminare i residui di agente immobilizzante non reagito, il vetrino funzionalizzato è pronto per essere inserito nella soluzione colloidale, all'interno della quale sarà possibile la formazione di un legame con la superficie carica delle nanoparticelle, in modo da indurre l'immobilizzazione delle stesse sulla superficie vetrosa.

Per quanto riguarda invece le cinetiche di adsorbimento esse sono state oggetto di studio: una trattazione dettagliata del fenomeno è stata proposta da Park (1999) a cui si rimanda. In particolare in questo articolo si ricava la legge di proporzionalità fra il tempo di immersione del vetrino nel colloide e l'aumento del numero delle nanoparticelle che si depositano sopra di esso.

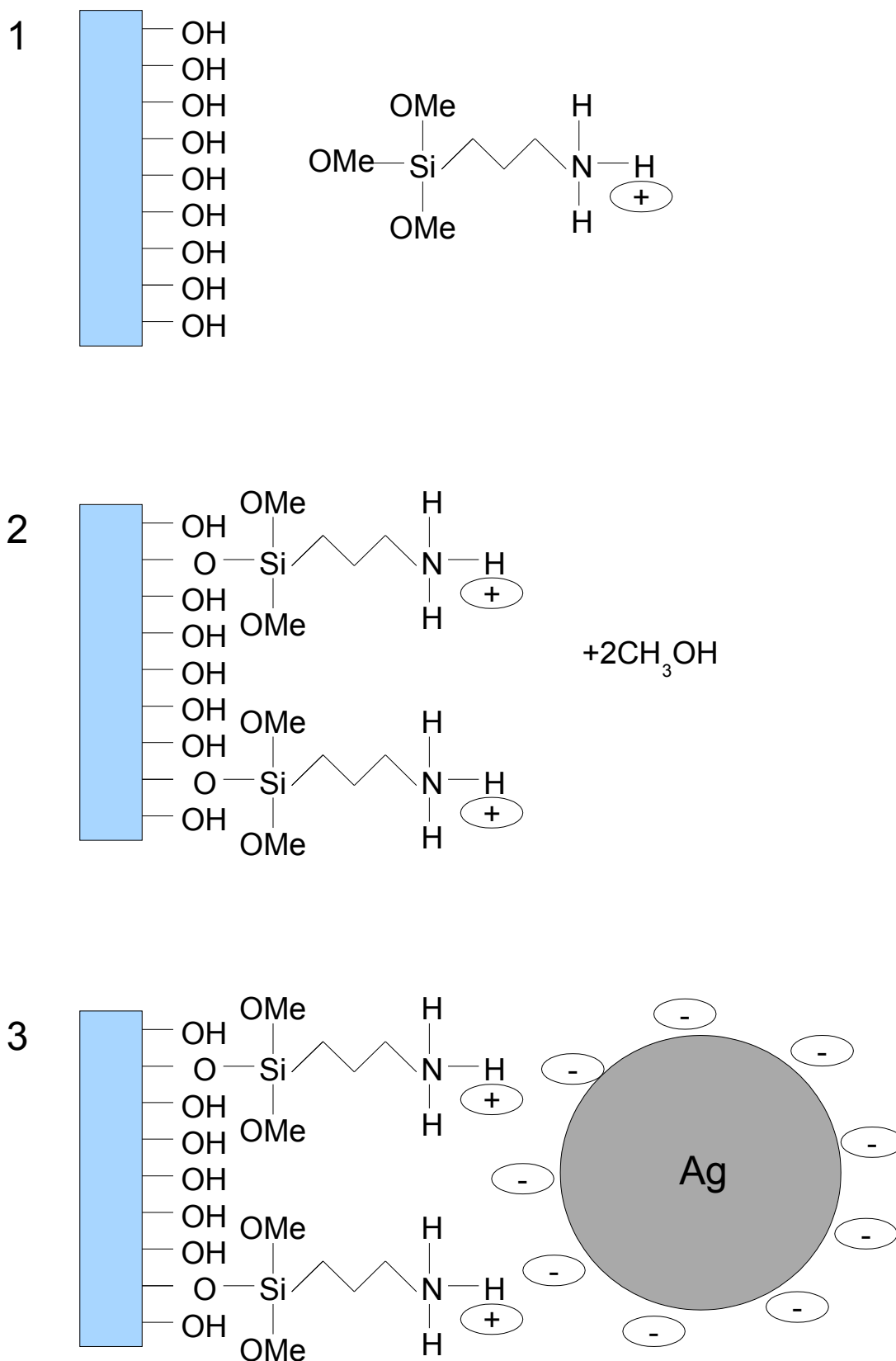


Figura 43. Processo di immobilizzazione delle nanoparticelle di argento su substrati di vetro funzionalizzati con APTMS. Durante l'immersione del vetrino nella soluzione contenente l'APTMS (1) si crea un legame covalente tra vetro e molecola che produce metanolo in soluzione (2). A questo punto il vetrino funzionalizzato può essere immerso nella soluzione colloidale in modo da formare un legame chimico il quale permette l'immobilizzazione della nanoparticella sulla superficie (3).

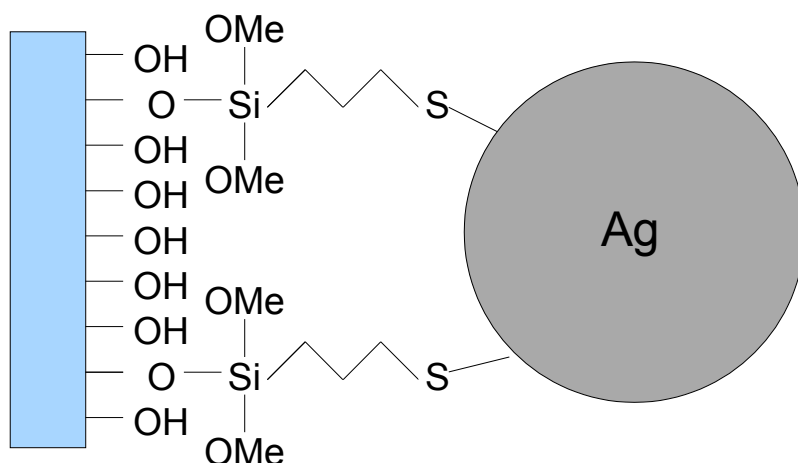


Figura 44. Processo di immobilizzazione delle nanoparticelle di argento su substrati di vetro funzionalizzati con MPTMS; dalla figura si nota la formazione, al termine del processo, di un legame covalente tra atomo di zolfo e nanoparticella di argento.

Terminato il processo di immobilizzazione, è consigliabile conservare i vetrini in acqua distillata al fine di limitare fenomeni di ossidazione e solforazione del substrato con il passare del tempo.

In figura 45 si riporta l'aspetto assunto dai vetrini al termine del processo di immobilizzazione. Per quanto riguarda le analisi al microscopio ottico effettuate si rimanda al capitolo 5, dove si mostreranno le proprietà di queste superfici nel produrre effetto SERS attraverso la registrazione di mapping su aree ben definite.

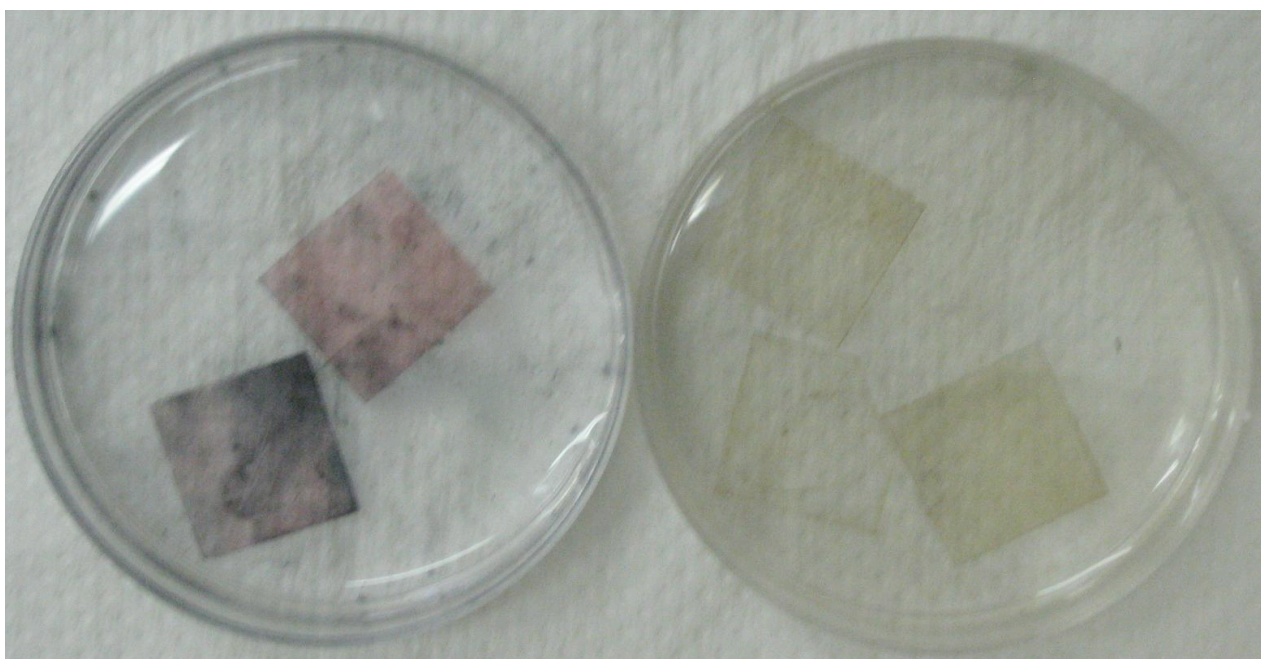


Figura 45. Vetrini funzionalizzati con APTMS e con nanoparticelle di oro (a sinistra) e di argento (a destra) immobilizzate.

Come è possibile osservare dalla figura 45, nonostante tutti gli accorgimenti presi durante i processi di risciacquo, la formazione di multilayer e di aggregati di nanoparticelle sulle superfici risulta inevitabile, portando il vetrino ad assumere una colorazione non uniforme. Tuttavia per le analisi di mapping Raman che si andranno ad effettuare su di essi ciò non rappresenta un problema, in quanto le porzioni del substrato analizzate saranno così piccole da permettere di effettuare mappature in regioni sufficientemente uniformi dello stesso.

La formazione di aggregati sulla superficie vetrosa può essere studiata mediante spettri di assorbimento, i quali in presenza di aggregazione mostrano delle bande a lunghezze d'onda maggiori di quelle tipiche del plasmon che caratterizza l'assorbimento delle nanoparticelle isolate (figura 46).

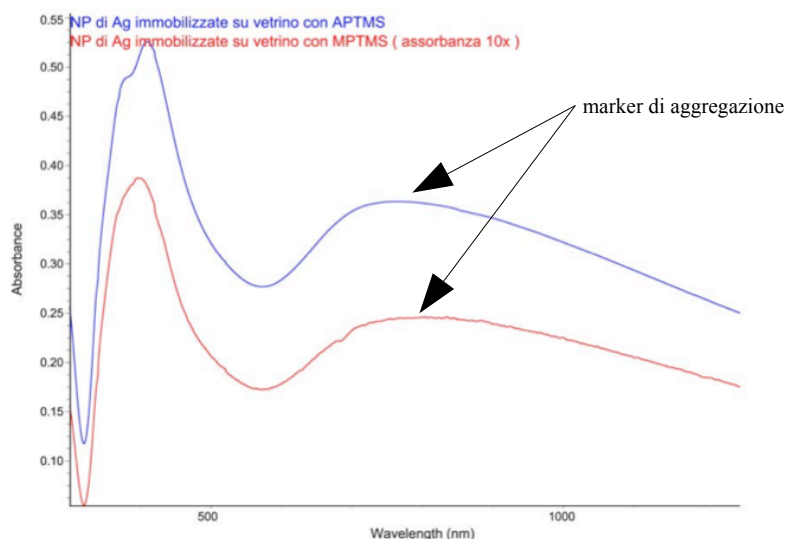


Figura 46. Nanoparticelle di argento immobilizzate su vetrino con APTMS e MPTMS. I dati sono presi da letteratura [Pesapane (2005)].

Come mostrato dagli spettri di figura 46 oltre al picco delle nanoparticelle isolate poco sopra i 400 nm, si ha un altro massimo di assorbimento molto largo a circa 850 nm, caratteristico di una risonanza plasmonica collettiva. Questo è dovuto da un lato al fatto che durante l'immobilizzazione le nanoparticelle sono più vicine rispetto a quando sono in soluzione, dall'altro ad una vera e propria azione aggregante promossa dall'agente immobilizzante. Nel caso dell'APTMS infatti, questa molecola crea uno sbilanciamento delle cariche superficiali del primo strato di nanoparticelle favorendo l'aggregazione. Inoltre se presente in eccesso, può contribuire ulteriormente all'immobilizzazione di più strati di nanoparticelle.

Il MPTMS invece lega come detto le nanoparticelle covalentemente e non ha una terminazione carica come il gruppo -NH_3^+ . Questo dovrebbe far pensare che le nanoparticelle così immobilizzate formino un monolayer o poco più. La presenza di layer aggiuntivi anche con questo agente immobilizzante è attribuibile sia alla presenza di cluster di nanoparticelle già formatesi in soluzione, sia alla differenza di elettronegatività tra l'atomo di zolfo (più elettronegativo) e quello di argento, che porta alla formazione anche in questo caso di uno sbilanciamento della carica sulla nanoparticella [Park (1999)].

Sempre con riferimento alla figura 46 si nota comunque che l'assorbanza del vetrino trattato con APTMS è molto maggiore. Questo conferma il fatto che utilizzando un aminosilossano si ottengono strati più spessi di nanoparticelle. Infatti il legame con le particelle di sicura natura elettrostatica crea uno sbilanciamento di carica sulla nanoparticella molto più rilevante che nel caso del MPTMS, rendendo possibile la formazione di più layer.

Capitolo V

Detezione SERS dell'apomorfina

5.1 Introduzione

Uno degli scopi principali di questo lavoro di tesi è quello di studiare l'effetto SERS di una molecola di interesse interagente con i colloidali sintetizzati. Come sarà mostrato in seguito, elevati innalzamenti dello scattering Raman possono essere ottenuti non solo tramite aggregazione o semplice concentrazione dei colloidali, ma anche a partire dai substrati solidi di nanoparticelle ottenuti dal processo di silanizzazione del vetro (*cf.* paragrafo 4.5).

Gli analiti impiegati durante questo lavoro di tesi sono stati l'apomorfina, il malachite-green e il 2-naftalentiolo, le cui formule di struttura saranno mostrate nei paragrafi seguenti. Fra questi l'apomorfina è stata sicuramente la molecola oggetto di maggiore interesse, in quanto essa è impiegata come principio attivo nei farmaci per il trattamento del morbo di Parkinson, e offre la possibilità di condurre studi che portino successivamente ad uno sbocco applicativo in ambito medico. Le analisi sperimentali effettuate su questo farmaco hanno mirato ad ottenere l'effetto SERS sia in sospensione colloidale che su substrati solidi.

Tuttavia per meglio interpretare i risultati ricavati dalle analisi sull'apomorfina è stato necessario condurre preventivamente studi sperimentali sulle altre due molecole, le quali potrebbero essere definite in questo caso "ausiliarie", in quanto costituiscono dei buoni "marker" che permettono di comprendere le proprietà SERS dei colloidali e dei substrati, senza le complicazioni portate da molecole soggette a fenomeni di ossidazione e fotodegradazione.

In particolare i risultati ottenuti sul SERS della malachite-green hanno permesso di ricavare informazioni dettagliate sulla riproducibilità delle misure e sulla cinetica del segnale. La possibilità infatti di ottenere misure SERS fra loro riproducibili su campioni diversi a parità di tutte le condizioni sperimentali è uno dei maggiori campi di studio su cui si stanno rivolgendo le attenzioni di molti gruppi di ricerca. Inoltre la conoscenza più accurata dell'evoluzione del segnale SERS nel tempo permetterebbe di condurre le misure nel momento di massima intensità dello stesso,

abbassando in questo modo i limiti di rilevazione finora raggiunti.

Per quanto riguarda invece il 2-naftalentiolo, esso è stato impiegato principalmente per testare la risposta SERS dei substrati solidi quando questi sono fatti interagire con un analita gassoso. I risultati ottenuti dai mapping Raman dei substrati metallici hanno permesso di mostrare che i maggiori enhancement sono ottenibili utilizzando argento invece che oro, e che l'innalzamento dello scattering è fortemente dipendente dalla struttura microscopica delle zone mappate.

In conclusione la possibilità di caratterizzare separatamente colloidali e substrati mediante molecole modello (i cui spettri SERS sono noti e compresi ormai da tempo) ha permesso una più semplice trattazione delle analisi e una più veloce comprensione dei risultati ottenuti in seguito per l'apomorfina. Tale molecola infatti presenta complessi fenomeni di ossidazione che portano allo sviluppo di varie forme in equilibrio fra loro. Oltre a ciò gli spettri SERS che si ricavano sono soggetti a forti variazioni dei rapporti di intensità relativa delle bande, dovuti ai vari modi con cui la molecola è in grado di legarsi alle nanoparticelle metalliche.

Dopo una breve presentazione delle molecole impiegate, saranno mostrati i risultati sperimentali ottenuti, essi possono essere ricondotti ai seguenti tre aspetti fondamentali di indagine riguardanti il SERS:

- Detezione di analiti attraverso colloidali concentrati o fatti aggregare con aggiunta di NaCl
- Riproducibilità e cinetica in soluzione acquosa
- Rilevazione di analiti su substrati solidi con nanoparticelle immobilizzate

5.2 Apomorfina

L'apomorfina (Aporphine-10,11-diol, CA Registry Number 58004) è un derivato della morfina scoperto nel 1869 da Mattheisen e Wright [Mattheisen (1869)] e trova impiego in ambito medico per la cura dei pazienti affetti dal morbo di Parkinson, malattia cronica neurodegenerativa i cui sintomi principali sono il sopravvento di tremori e rigidità. Le cause di questa malattia sono dovute alla perdita di neuroni in una particolare zona del cervello, chiamata *substantia nigra* [Menon (1941)]. Questi neuroni, quando attivi, sintetizzano e rilasciano dopamina, un neurotrasmettitore responsabile del processo di controllo nervoso del movimento. Al fine quindi di restaurare la carenza dopaminergica la strategia terapeutica fondamentale consiste nell'impiego di agonisti della dopamina attraverso, per esempio, l'assunzione per via orale della levodopa, sostanza capace di bypassare la barriera sangue-cervello (a differenza della dopamina) e di trasformarsi, attraverso

decarbossilazione, in dopamina direttamente nel cervello. Tuttavia dopo un periodo di trattamento iniziale nel quale i sintomi sono assenti (“on” periods), si osservano in seguito un aumento degli intervalli temporali nei quali i sintomi riappaiono (“off” periods) [Muguet (1995)].

Fra le molte sostanze che agiscono come agonisti della dopamina e che sono in grado di aumentare la durata degli “on” periods, vi è proprio l'apomorfina, la quale è sicuramente uno degli agenti più efficaci. Tale sostanza oltre a poter essere assunta per via orale, a causa delle sue proprietà farmacocinetiche viene somministrata solitamente mediante ripetute iniezioni sottocutanee più volte al giorno, in quanto il sollievo dai sintomi non supera le tre ore [Argiolas (2001)].

In figura 1 è riportata la composizione chimica dell'apomorfina-idrocloruro, che è il principio attivo farmaceutico utilizzato.

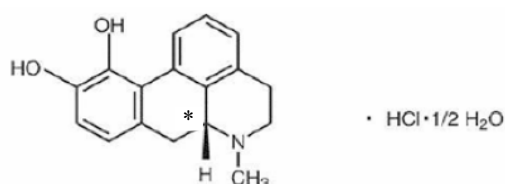


Figura 1. Formula chimica dell'apomorfina-idrocloruro ($C_{17}H_{17}NO_2 \cdot HCl \cdot 1/2 H_2O$), il cui peso molecolare risulta 312,79 g/mol.

L'apomorfina-idrocloruro si presenta come un polvere bianca molto fine e solubile in acqua a temperatura ambiente. In particolare il farmaco commercialmente diffuso, l'Apofin[®], è una soluzione acquosa inodore e incolore che, oltre al principio attivo, contiene metabisulfito di sodio e acido cloridrico.

Fra tutte le tecniche sperimentali volte ad analizzare e a studiare questa molecola, la spettroscopia Raman offre molti vantaggi, come ad esempio:

- Limitata preparazione dei campioni da analizzare
- Possibilità di utilizzo di microscopi e fibre ottiche
- Condizioni di set-up sperimentali relativamente semplici
- Utilizzo di varie linee eccitatrici per aumentare l'efficienza di rilevazione

Ai vantaggi di questo tipo di spettroscopia si possono sommare quelli tipici del SERS, i quali, mantenendo le dettagliate informazioni derivanti dalla struttura vibrazionale della molecola, permettono di abbassare notevolmente i limiti di detezione, arrivando in teoria fino a quelli terapeutici presenti all'interno del paziente dopo la somministrazione.

Proprio grazie ai vantaggi delle tecniche spettroscopiche vibrazionali, nel corso di questi ultimi anni è stato possibile sviluppare uno stato dell'arte su questa molecola sufficientemente dettagliato. Tra i risultati più recenti è bene citare l'interpretazione teorica degli spettri Raman dell'apomorfina mediante calcoli density functional theory (DFT) [Lucotti (2009)], come mostrato in figura 2.

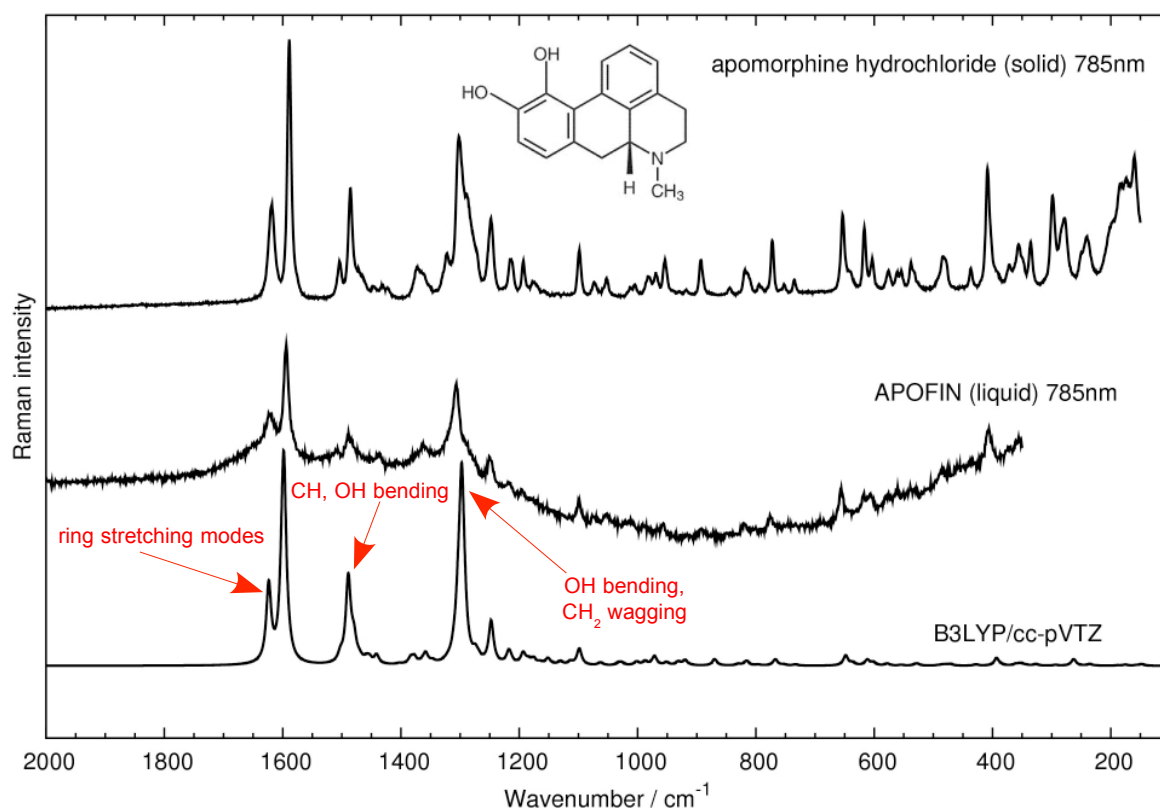


Figura 2. In alto spettro Raman dell'apomorfina-idrocloruro solida; al centro spettro Raman dell'Apofin®; in basso spettro teorico dell'apomorfina ottenuto mediante tecniche DFT.

Dagli spettri di figura 2 i modi vibrazionali Raman più intensi che possono essere effettivamente usati per il riconoscimento della molecola sono quelli di stretching dei due anelli aromatici attorno a 1600 cm^{-1} . Per la precisione il picco a 1618 cm^{-1} è connesso allo stretching dell'anello catecolico accoppiato con il bending nel piano dell'OH, mentre quello a 1589 cm^{-1} è dovuto allo stretching dell'altro anello, collegato al bending nel piano del legame CH. Un'altra banda importante comune a tutti gli spettri è relativa ai bending nel piano dei legami CH e OH attorno a 1489 cm^{-1} . Infine occorre sottolineare la presenza attorno ai 1300 cm^{-1} del modo normale relativo ancora al bending nel piano del legame OH con un contributo di wagging del CH_2 ; tale modo risulta importante in quanto la sua presenza, come sarà mostrato in seguito, permette di escludere processi di ossidazione subiti dalla molecola che comportano la perdita di idrogeno sui gruppi OH del catecolo.

Per quanto riguarda invece lo spettro SERS dell'apomorfina la sua interpretazione si è dimostrata particolarmente difficoltosa per una serie di ragioni, tra le quali l'instaurarsi di interazione chimica con il substrato metallico, che porta una modifica della struttura elettronica e vibrazionale della molecola e causa shift in frequenza dei modi vibrazionali. Anche in questo caso sono state eseguite analisi teoriche tramite DFT [Lucotti (2010)] tese a trovare un modello adatto per spiegare le differenze riscontrabili fra spettri Raman e SERS. Considerando infatti l'instaurarsi di un legame chimico sulla superficie metallica di una nanoparticella una molecola di apomorfina potrebbe assumere, in seguito ad ossidazione, la seguente configurazione (figura 3).

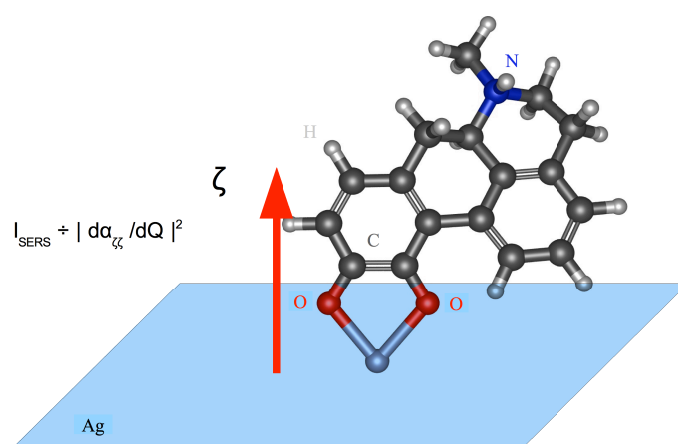


Figura 3. Possibile posizionamento di una molecola di apomorfina ossidata, in seguito alla formazione di un legame chimico, rispetto ad un piano definito da un vettore normale ζ , che indica la giacitura della superficie metallica di una nanoparticella rispetto alla molecola chemisorbita.

Tuttavia è ben noto dalla letteratura [Garrido (2002)] che l'apomorfina può subire fenomeni di ossidazione che la portano ad assumere una serie di forme diverse fra loro. È ragionevole ritenere che queste forme inducano la formazione di differenti legami e/o orientazioni rispetto alla nanoparticella metallica con cui si legano. Da queste considerazioni sulla variazione della struttura chimica e sulle differenti forme raggiunte tramite ossidazione è comprensibile una differenziazione anche marcata fra gli spettri Raman e SERS della molecola. Nella figura 4 vengono riassunti i risultati ottenuti da trattazioni teoriche DFT [Lucotti (2010)] e confrontati con le osservazioni sperimentali. Dalla figura 4 sono immediatamente riscontrabili differenze nelle posizioni dei picchi principali fra gli spettri ottenuti sperimentalmente da analisi Raman e SERS. Inoltre i due spettri SERS mostrano una ricchezza di picchi maggiore del loro corrispettivo Raman. Confrontando ora i due spettri SERS sperimentali con le analisi teoriche, si nota che una simulazione in cui si ipotizzi che le molecole abbiano un comportamento simile a quello che avrebbero se fossero libere di muoversi in soluzione (spettro in blu) non è accettabile: da ciò la conferma della formazione di un legame chimico specifico con le nanoparticelle. Ipotizzando allora, come mostrato in figura 3, la

formazione di un legame in seguito ad ossidazione e la disposizione della molecola lungo una precisa direzione ζ rispetto alla superficie della nanoparticella, per effetto dell'enhancement elettromagnetico del SERS, solamente alcune componenti del tensore Raman saranno attive (in particolare $da_{\zeta\zeta}/dQ$). Ciò comporterà la “disattivazione” nello spettro dei segnali i cui modi non promuovono variazioni di polarizzabilità orientate lungo questa direzione. Non a caso infatti lo spettro in arancione presenta meno bande di quello in blu e riesce meglio di quest'ultimo ad avvicinarsi al risultato sperimentale. Tuttavia le differenze che ancora si riscontrano con i due spettri di riferimento sono come detto imputabili alle varie forme di ossidazione in equilibrio tra loro in date condizioni sperimentali, e alle inevitabili fluttuazioni di orientazione con cui la molecola si dispone per formare il legame con la nanoparticella.

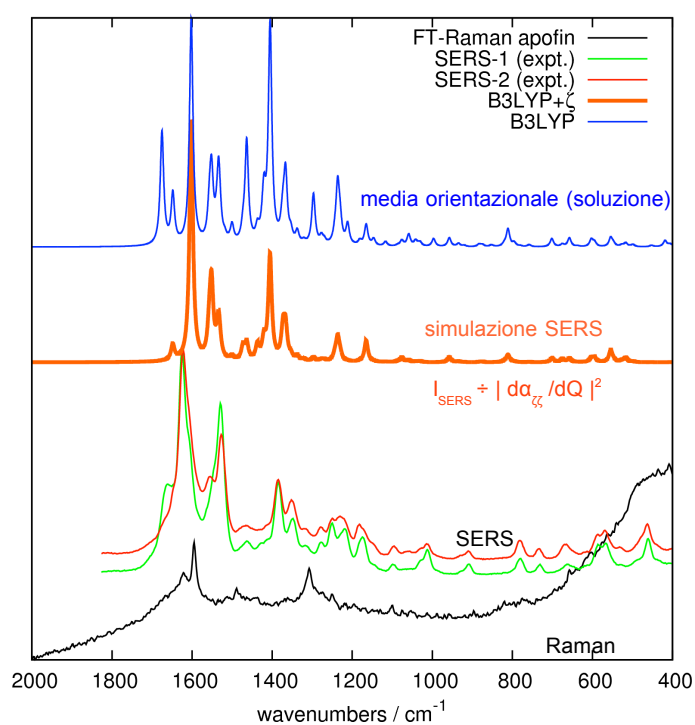


Figura 4. Confronto tra analisi sperimentali e teoriche sul SERS dell'apomorfina.

Nella tabella 1 vengono riportate le posizioni di picchi principali dell'apomorfina ossidata ottenute dalla simulazione DFT [Lucotti (2010)] con le rispettive intensità relative, le posizioni dei segnali SERS sperimentali e la descrizione dei modi normali loro connessi.

Nome picco	Posizione teorica picco (cm ⁻¹)	Intensità relativa teorica SERS	Posizione sperimentale picco (cm ⁻¹)	Descrizione modo normale
A	1648	0,06	1643	Stretching anello catecolico
B	1602	1,00	1619	Stretching anello catecolico
C	1550	0,24	1530	Scissoring CH ₂ – Bending CH ₃
D	1533	0,15	1522	Scissoring CH ₂ – Bending CH ₃
E	1405	0,41	1380	Wagging CH– Bending NH – Stretching CO - Bending CH nel piano anello aromatico – respiro anello catecolico
F	1372	0,11	1343	Bending CH nel piano anello aromatico - Stretching CO - Stretching CC collettivo anelli
G	1266	0,10	1246	Bending CH ₂ e CH anelli - Stretching CO - Stretching CC collettivo anelli – Bending NH – Bending C*H
H	1236	0,09	1216	Bending CH nel piano anello aromatico – Twisting CH ₂ - Bending C*H
I	1165	0,08	1170	Bending NH - Twisting CH ₂ - Bending C*H - Bending CH nel piano anello aromatico e non aromatico

Tabella 1. Posizione delle bande sperimentali e teoriche dell'apomorfina ossidata e relativi modi normali. Per il riconoscimento del C* si rimanda alla figura 1 di questo paragrafo.

Nell'ultima parte di questo capitolo saranno mostrati i mapping relativi al SERS dell'Apofin[®], ottenuti con substrati solidi di nanoparticelle di oro e argento immobilizzate su vetro. Si vuole ora anticipare che i segnali SERS registrati non mostrano sostanziali variazioni né in funzione delle condizioni di misura né del metallo utilizzato. In figura 5 si riportano tre spettri di cui quello in rosso è relativo al SERS della molecola ottenuto su una semplice lastra di silice porosa per TLC (Thin Layer Chromatography). Per la registrazione di questo spettro è stata deposta una goccia di una soluzione acquosa 10⁻⁷ M di Apofin[®] sul substrato TLC e lasciata assorbire. Successivamente è stata aggiunta nello stesso punto una goccia di soluzione di nanoparticelle di argento, il cui repentino processo di aggregazione è stato riscontrato con un viraggio di colore verso il grigio scuro. Queste nanoparticelle erano state precedentemente concentrate 20 volte rispetto alla concentrazione di sintesi mediante centrifuga. Passato il tempo necessario per l'assorbimento del colloide si è proceduto alla registrazione dello spettro, il quale non mostra differenze sostanziali rispetto a quello in viola, relativo al SERS della molecola su substrato di nanoparticelle di argento immobilizzate e nemmeno rispetto a quello in verde, registrato su substrato di oro immobilizzato.

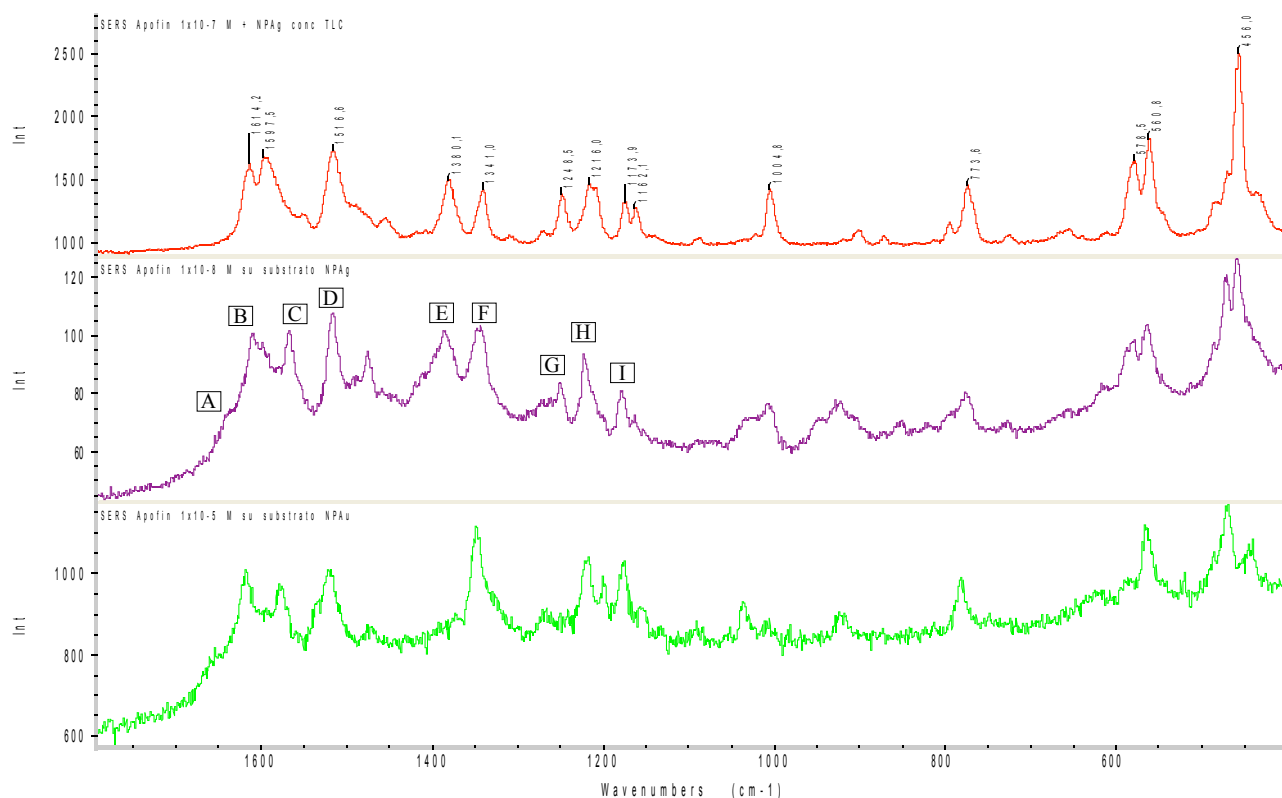


Figura 5. Sostanziale equivalenza negli spettri SERS dell'Apofin® registrati al variare dei substrati e del metallo. Lo spetto in rosso riporta i numeri d'onda delle bande principali osservate, mentre sullo spetto in viola sono state riportate, in corrispondenza dei picchi, le lettere che identificano le bande caratteristiche, avendo come riferimento la tabella 1. Il laser utilizzato per le misure ha lunghezza d'onda di 785 nm.

5.3 Malachite-green e 2-naftalentiolo

In questo paragrafo saranno brevemente presentate le due molecole utilizzate come riferimento per testare i colloidali sintetizzati e i substrati metallici con nanoparticelle immobilizzate.

Il malachite-green (figura 6), un colorante appartenente alla classe dei trifenilmetani, è una molecola che presenta una buona affinità con le nanoparticelle stabilizzate con trisodio citrato a causa della presenza del controione cloro, ed è quindi in grado di fornire elevati segnali SERS a causa della significativa interazione con la superficie di argento.

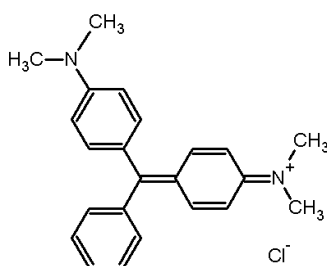


Figura 6. Formula strutturale della malachite-green, il cui peso molecola è 364,91 g/mol.

Oltre a ciò il suo spettro SERS è stato ampiamente studiato e compreso [Domke (2006)]: questi fattori quindi sono stati ritenuti fondamentali nel selezionarla come molecola modello per studiare le caratteristiche di riproducibilità del SERS in soluzione acquosa. Essa trova applicazioni principalmente nell'ambito dell'itticoltura e dei mangimi animali, essendo utilizzata per la sua elevata attività antibatterica, antiparassitaria e fungicida*.

In figura 7 si riportano due spettri SERS della molecola presi da letteratura [Pesapane (2009)] che saranno utilizzati per il confronto con i dati sperimentali mostrati successivamente.

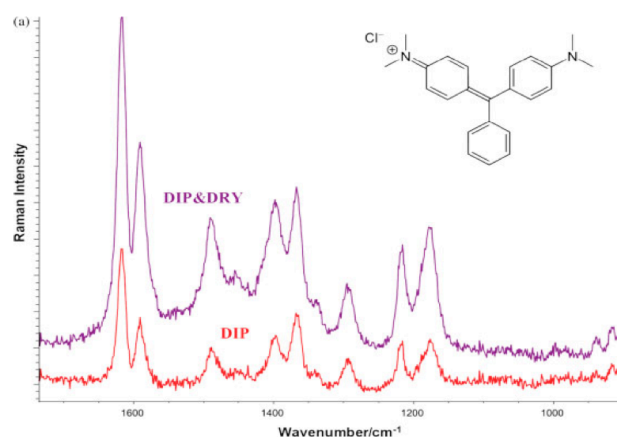


Figura 7. Spettri SERS della malachite-green registrati in soluzione acquosa tramite fibra ottica rivestita di nanoparticelle di argento [Pesapane (2009)].

L'altra molecola impiegata per testare i substrati solidi di nanoparticelle immobilizzate è il 2-naftalentiolo (figura 8).

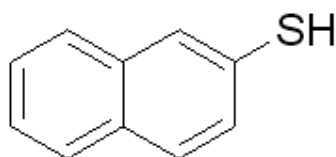


Figura 8. Formula di struttura del 2-naftalentiolo, il cui peso molecolare è di 160,24 g/mol.

L'impiego di questa molecola è stato suggerito dalla capacità che presenta, dopo essere stata dispersa allo stato gassoso, di adsorbirsi chimicamente sulle superfici metalliche nanostrutturate tramite la formazione di un legame tra zolfo e metallo (figura 9), e di fornire in questo modo elevati segnali SERS.

* General Low Regulation (EC) No 178/2002

Ufficio Federale della Sanità Pubblica: **“Rapporto annuale 2001. Sicurezza delle derrate alimentari”**

Community Outreach & Education Programs. Environmental Health Sciences Center University of Rochester, 1999: **“What’s in our water?”**

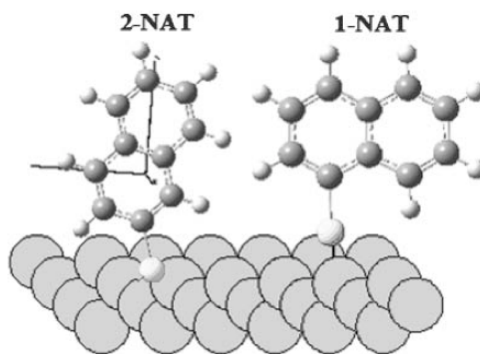


Figura 9. Meccanismi di adsorbimento proposti per l'1-naftalentiolo e il 2-naftalentiolo su superfici metalliche nanostrutturate.

L'articolo preso come riferimento per la detezione e il riconoscimento dei segnali SERS della molecola è quello di Alvarez-Puebla (2004) a cui si rimanda. In figura 10 si riportano gli spettri SERS della molecola al variare delle condizioni sperimentali. Le posizioni delle bande riportate saranno successivamente prese come riferimento per il confronto con i dati sperimentali ottenuti. Le bande a 1620, 1580, 1567 e 1378 cm^{-1} sono relative allo stretching dei legami CC, mentre quella a 1068 cm^{-1} è relativa alla vibrazione di bending simmetrica dei legami CH.

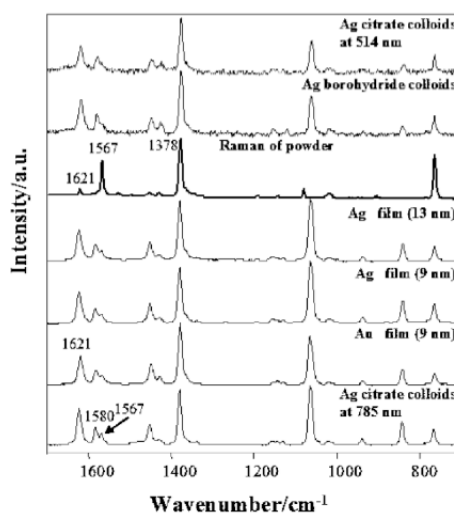


Figura 10. Spettri SERS del 2-naftalentiolo: al variare delle condizioni sperimentali di analisi si nota tuttavia una costanza nella posizione delle bande. I dati sono presi da letteratura [Alvarez-Puebla (2004)].

5.4 Detezione dell'apomorfina tramite colloidali concentrati o aggregati

Un primo aspetto interessante è stato quello di verificare l'efficacia della semplice concentrazione dei colloidali sintetizzati precedentemente. Mediante una semplice centrifugazione ad elevato numero di giri (18000 RPM), è stato possibile concentrare la soluzione colloidale contenente le

nanoparticelle separando il fondo concentrato dalla fase soprannatante divenuta limpida. Le concentrazioni dei colloidi ricavate dopo la centrifugazione sono state circa 20 volte maggiori rispetto a quelle di partenza: al di sopra di questo limite infatti il colloide è troppo concentrato e rischia di aggregare velocemente. Proprio per questo motivo non si sono effettuate concentrazioni più spinte. Le analisi, effettuate in soluzione acquosa di apomorfina con l'aggiunta del colloide concentrato, hanno riguardato quasi esclusivamente l'argento, in quanto è con questo metallo che si sono ottenuti dei valori di enhancement veramente significativi a bassi livelli di concentrazione dell'analita. Affinché durante queste misure fosse massimizzato l'effetto di risonanza con il laser utilizzato ($\lambda = 457 \text{ nm}$) si è deciso di utilizzare il colloide sintetizzato tramite seed-solution (*cf.* paragrafo 4.3.8), il quale presenta proprio un picco di assorbimento plasmonico in corrispondenza della lunghezza d'onda eccitatrice. In figura 11 si mostra un confronto tra due spettri dell'Apofin® alla stessa concentrazione, nel quale quello in rosso è stato ottenuto concentrando 20 volte il colloide. Dalla figura si nota un forte aumento del segnale tramite la concentrazione del colloide e possono essere riconosciute le bande A, B, D ed E dell'Apofin® dal confronto con quelle di figura 5. Si osserva come sarebbe stato molto più difficile effettuare un confronto e un riconoscimento dei segnali della molecola unicamente per mezzo dello spettro in blu.

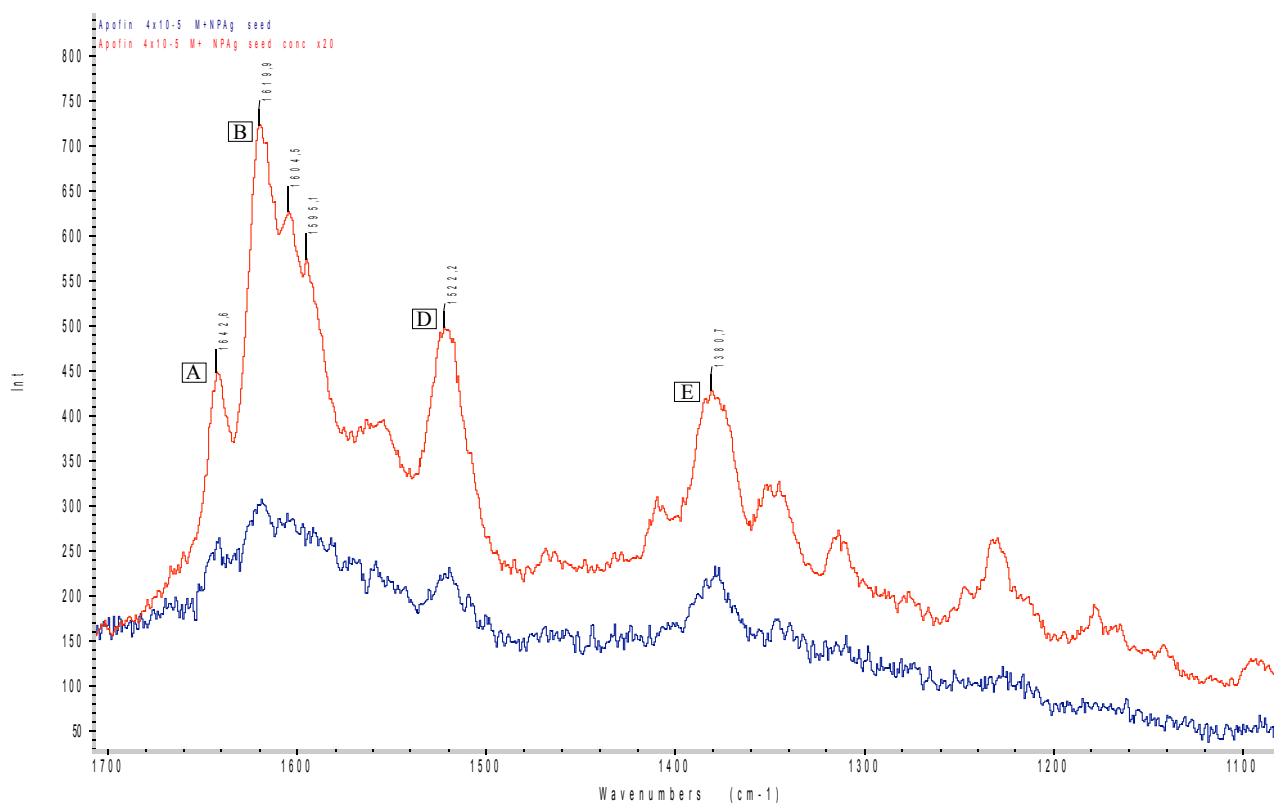


Figura 11. Spettri SERS dell'Apofin® in soluzione acquosa ($4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) misurati con colloide concentrato (in rosso) e non concentrato (in blu).

Accertata a questo punto l'efficacia che riveste la fase di centrifugazione del colloide nel registrare segnali SERS della molecola, sono state effettuate analisi a bassissime concentrazioni sempre con tale colloide centrifugato, al fine di avvicinarsi il più possibile al limite minimo di detezione della molecola. A tale scopo si riportano in figura 12 due spettri dell'Apofin[®] registrati in soluzione acquosa con concentrazioni 10^{-8} e 10^{-9} M, dove sono chiaramente riconoscibili le bande A ed E dell'apomorfina. In particolare occorre notare il forte enhancement subito dal modo normale connesso alla banda A, la quale negli spettri SERS di figura 5 è appena accennata mentre diventa più intensa negli spettri di figura 12.

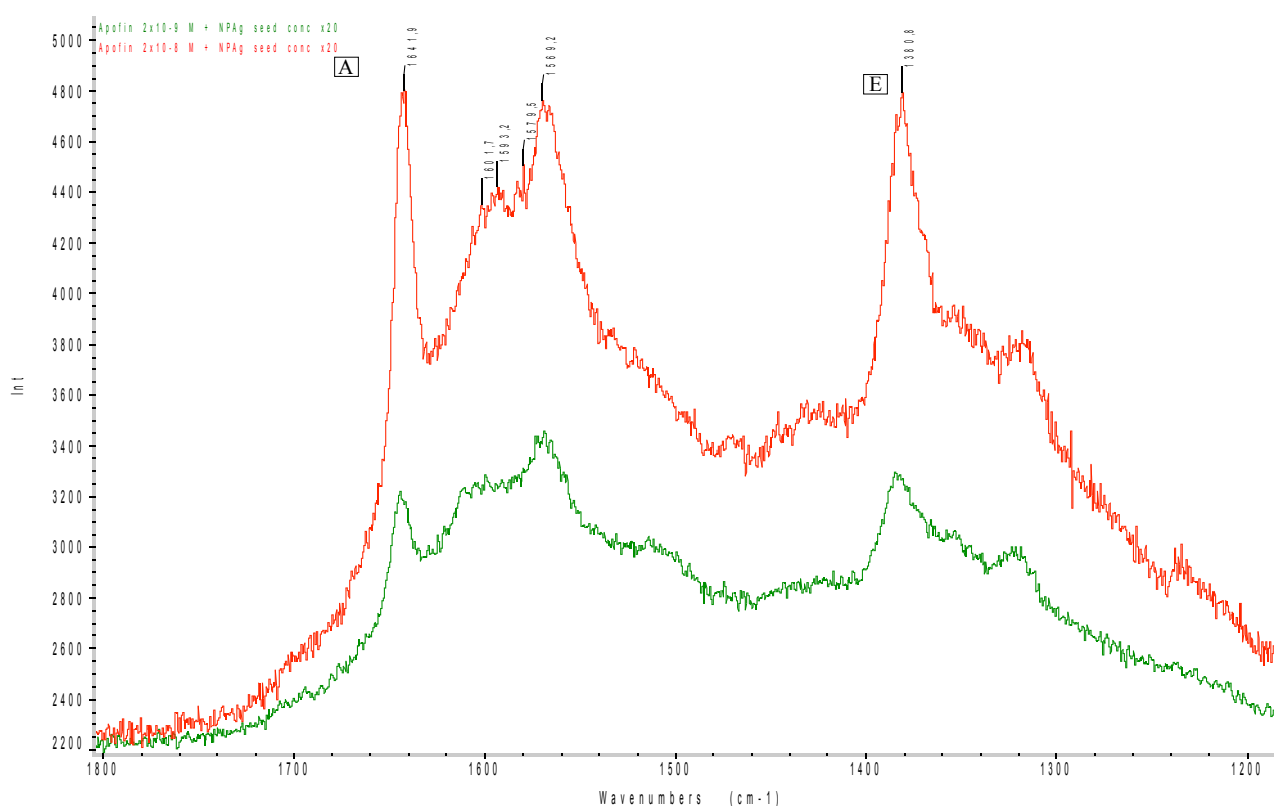


Figura 12. Spettri SERS dell'Apofin[®] 10^{-8} M (in rosso) e 10^{-9} M (in verde) registrati in soluzione acquosa con colloide concentrato 20 volte. Il laser utilizzato per le misure ha una lunghezza d'onda di 457 nm.

Come risulta dal confronto diretto gli spettri delle figure 5, 10 e 11 mostrano bande caratteristiche del SERS dell'apomorfina che subiscono importanti variazioni nei rapporti di intensità relativa. Il caso della banda A è emblematico: essa, presente nel modello teorico a 1648 cm^{-1} , è quasi impercettibile negli spettri SERS di figura 5, mentre negli spettri delle figure 10 e 11 subisce innalzamenti sempre più marcati, fino ad arrivare a poter essere presa come riferimento nel riconoscimento della molecola in figura 11. Questo fenomeno è una diretta conseguenza delle fluttuazioni caratteristiche del segnale SERS, imputabili principalmente ai moti browniani in

soluzione acquosa e alla diffusione dei cluster di nanoparticelle attraverso il volume di scattering [Etchegoin (2009), pag. 411]. I segnali misurati infatti dipendono fortemente dai moti delle molecole all'interno degli hot-spots e la misura SERS può quindi essere vista come un' "istantanea" scattata in un dato istante rispetto ad una situazione in continuo evolversi. Inoltre anche fluttuazioni nell'orientazioni relative (ζ) tra molecola e superficie è in grado di modificare l'intensità relativa delle bande ($I \propto |d\alpha_{\zeta}/dQ|^2$, cfr. paragrafo 5.2).

Occorre aggiungere infine che il fenomeno di fluttuazione dei segnali sarà esaltato dalla detezione a bassissime concentrazioni in quanto la misura sarà sempre più legata ad una situazione "locale" in cui poche molecole forniscono segnale. Per questi motivi per il riconoscimento della molecola è considerata sufficiente la presenza di due o più bande nello spettro e non necessariamente di tutte.

Un altro metodo per intensificare l'effetto SERS è quello di indurre un processo di aggregazione del colloide, in modo da entrare in risonanza con un'eccitatrice a più elevata lunghezza d'onda rispetto alla linea a 457 nm. Il fenomeno di aggregazione può essere indotto tramite l'aggiunta di un sale, (es. NaCl). Lo ione Cl^- infatti, prendendo il posto dello ione citrato di dimensioni maggiori, permette un avvicinamento delle nanoparticelle ad una distanza tale da far prevalere le forze attrattive di Van Der Waals a scapito di quelle repulsive elettrostatiche. Ciò comporta l'aggregazione progressiva del colloide in soluzione (cfr. paragrafo 4.2.5) e la formazione fra le nanoparticelle che si aggregano di *coupling dipolari* responsabili dell'effettivo red-shift dell'assorbimento plasmonico.

In figura 13 si riporta un confronto fra due spettri di Apofin[®] registrati con eccitatrice a 1064 nm su di una soluzione $3 \cdot 10^{-5}$ M di apomorfina in presenza di colloide. Lo spettro in rosso, a differenza di quello in blu, è stato registrato aggiungendo alla soluzione con molecola e colloide anche una decina di μL di soluzione acquosa di NaCl 10^{-2} M, che ha provocato una repentina aggregazione delle stesse portandole in risonanza con l'eccitatrice.

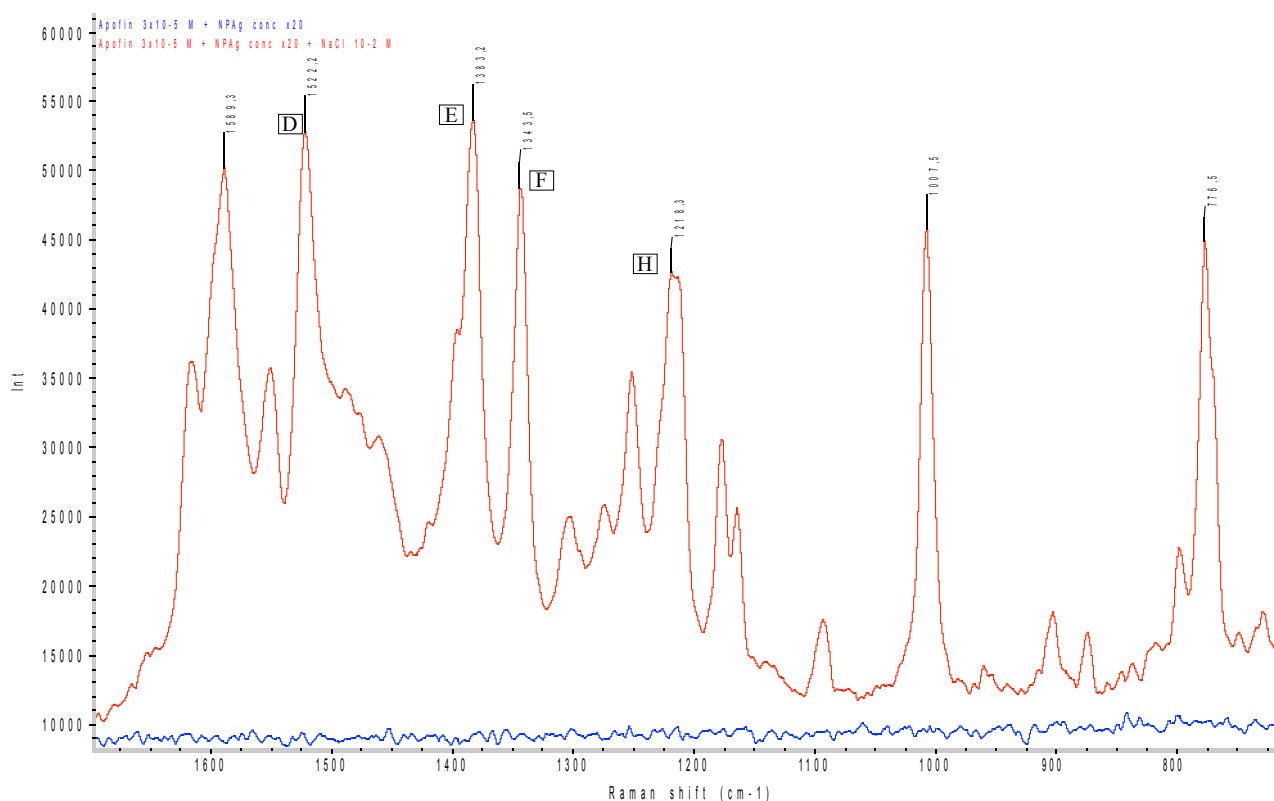


Figura 13. SERS dell'apomorfina in soluzione acquosa con nanoparticelle di argento misurati con eccitatrice a 1064 nm. Lo spettro in rosso riporta il campione a cui è stata aggiunta la soluzione acquosa di NaCl. Dal confronto con gli spettri di riferimento di figura 5, e avendo come riferimento la tabella 1, sono qui riconoscibili i picchi D, E, F e H della molecola.

5.5 Riproducibilità e cinetica del segnale SERS in sospensione acquosa

Nel paragrafo precedente è stato mostrato un esempio di rilevazione dell'apomorfina a bassissima concentrazione (10^{-8} e 10^{-9} M). Oltre al semplice rilevamento tuttavia, un altro aspetto fondamentale da indagare è la riproducibilità dei segnali, in quanto come mostrato precedentemente, essi sono soggetti a fluttuazioni e dipendono molto fortemente dalla presenza di eventuali cluster all'interno del volume di scattering, in grado di fornire gli hot-spot responsabili delle elevate intensificazioni. Da ciò è facile comprendere che, essendo i segnali fortemente dipendenti da una situazione locale durante la misura, specialmente alle basse concentrazioni sarà difficile ottenere intensità SERS riproducibili pur mantenendo i parametri sperimentali invariati. Risulta per questo motivo difficile mettere a punto ad esempio delle rette di taratura dei segnali in funzione della concentrazione, in grado cioè di fornire un riferimento del quantitativo di molecola analizzato durante le misure, in quanto tali rette sarebbero ricavate da punti sperimentali con dispersioni troppo elevate per avere stime affidabili.

A testimonianza di ciò si riportano in figura 14 vari spettri SERS della malachite-green a concentrazione costante (10^{-6} M) registrati con l'aggiunta di colloidale di argento e soluzione acquosa di NaCl 10^{-1} M. Tutti gli spettri sono stati ottenuti miscelando uguali volumi di analita, colloidale e soluzione salina, e attendendo sempre lo stesso tempo (3 minuti) dopo l'aggiunta di NaCl. Le misure sono state effettuate con un laser a 1064 nm al fine, anche in questo caso, di entrare in risonanza con gli aggregati formatisi in seguito all'aggiunta del sale.

Come si può notare dalla figura 14 i 6 campioni analizzati, a parità di tutte le condizioni sperimentali, mostrano delle variazioni sia delle intensità dei picchi che del fondo piuttosto significative. Il confronto dei segnali registrati con quelli di riferimento riportati in figura 7 confermano la corretta detezione della molecola campione. Si osservano tuttavia, fra le due figure, variazioni nei rapporti di intensità relative dei picchi: in figura 14 infatti la banda presa come riferimento per le analisi di riproducibilità è quella a 1396 cm^{-1} che è la più intensa: ciò invece non è verificato in figura 7, dove tale banda è presente ma non fornisce il segnale SERS più elevato.

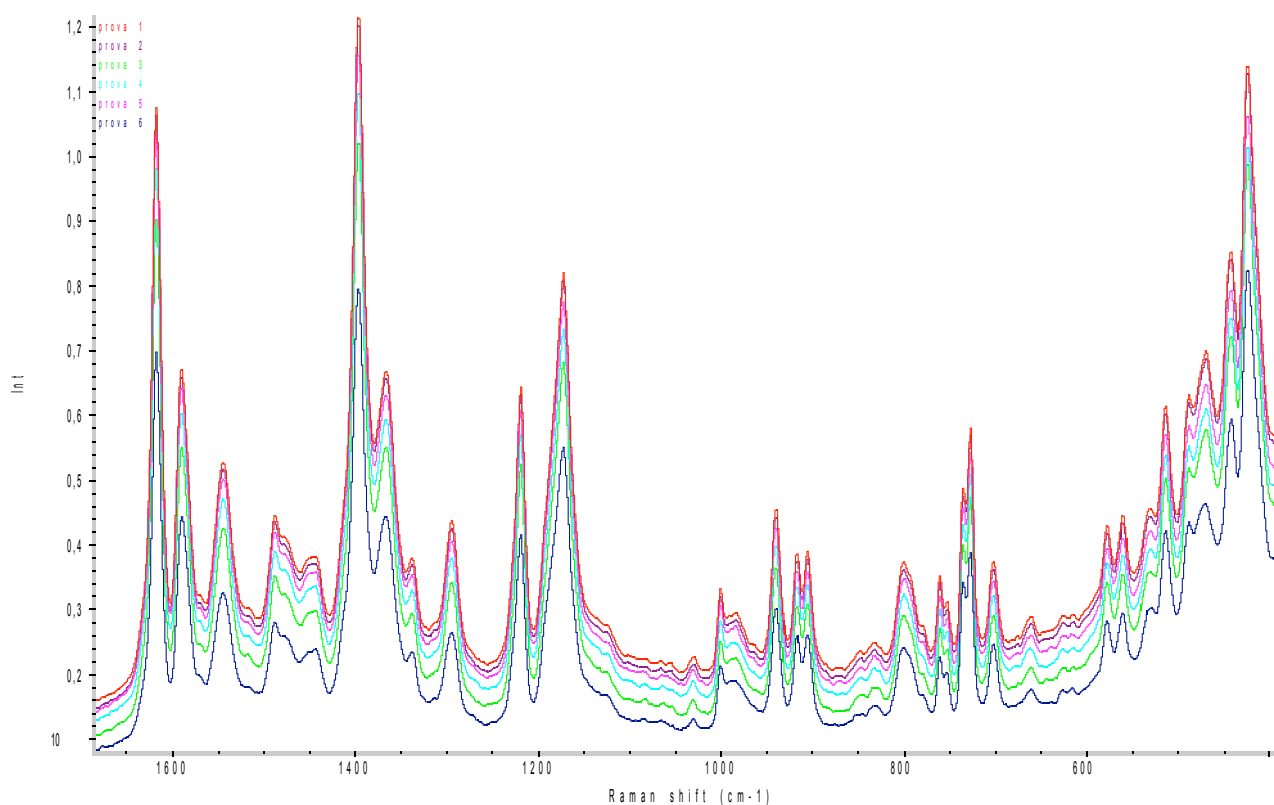


Figura 14. Prove di riproducibilità SERS effettuate con malachite-green 10^{-6} M, colloidale di argento e soluzione acquosa di NaCl 10^{-1} M.

Nella figura 15 sono riportate le intensità del picco a 1396 cm^{-1} per le varie prove, il valore medio e la deviazione standard percentuale σ risultano rispettivamente pari a 107531 unità arbitrarie e 14,20%.

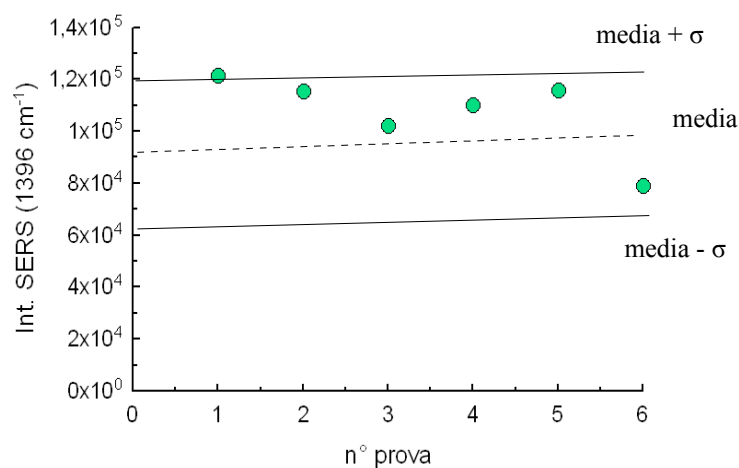


Figura 15. Intensità SERS delle bande a 1396 cm^{-1} per le varie prove riportate in figura 14.

Poiché l'aggiunta della soluzione salina si ripercuote come detto sull'aggregazione del colloide, è stato ritenuto interessante studiare la cinetica di aggregazione in modo da stimare, per i parametri sperimentali impiegati, il periodo di tempo in seguito al quale è possibile massimizzare il segnale SERS. Sempre mantenendo le concentrazioni di analita, soluzione salina e colloide costanti rispetto alle condizioni di misura utilizzate per le analisi descritte in figura 14, sono stati registrati quindi per uno stesso campione i segnali forniti dalla malachite-green in funzione del tempo, a partire dall'aggiunta del sale nella soluzione (figura 16).

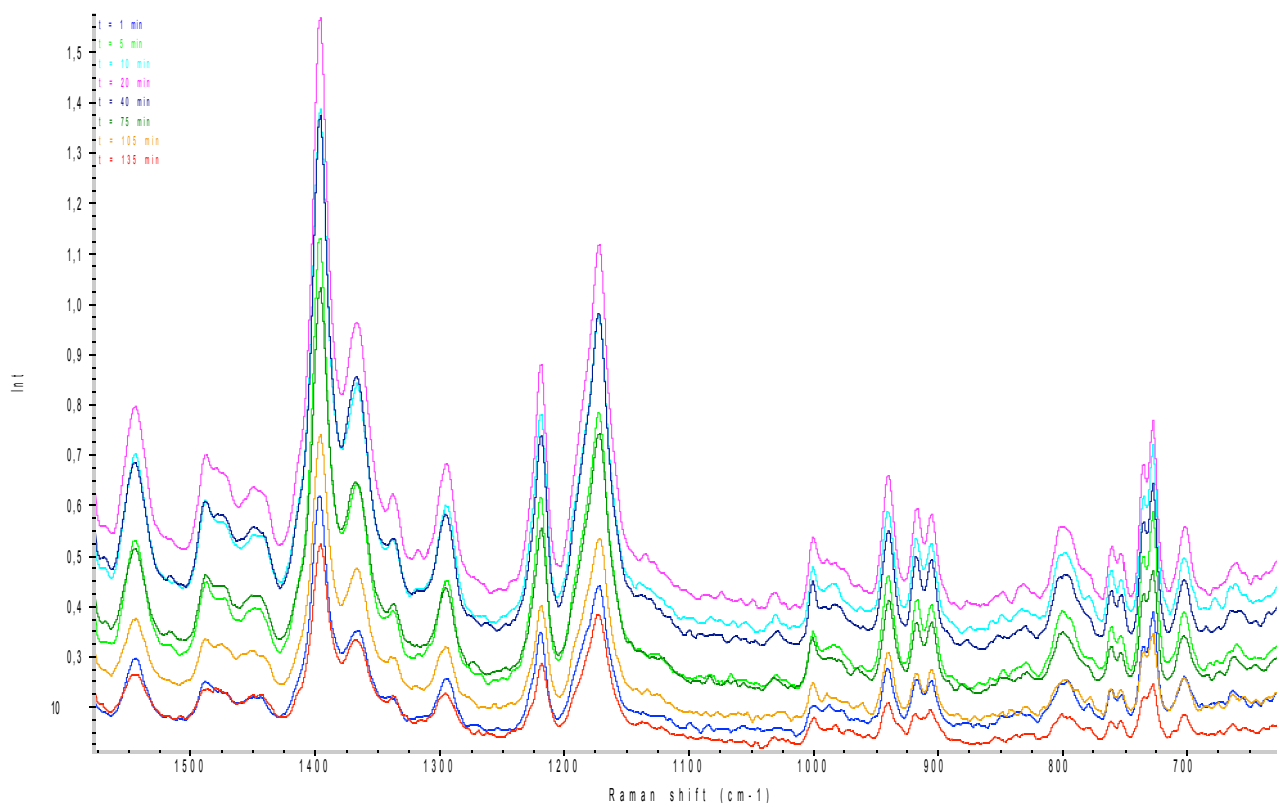


Figura 16. Spettri SERS della malachite-green registrati in funzione del tempo, a partire all'aggiunta della soluzione salina.

Riportando ora le intensità del picco a 1396 cm^{-1} registrato in funzione del tempo, è possibile notare dalla figura 17, un iniziale aumento dei segnali fino ad un massimo dopo 20 minuti e un successivo decremento degli stessi, al punto che, dopo 135 minuti dall'aggiunta della soluzione salina, i valori di intensità sono minori di quelli registrati dopo un minuto. La cinetica di aggregazione che subisce il colloide quindi può essere divisa in due stadi fondamentali: il primo, dall'aggiunta del colloide fino a 20 minuti, in cui gli aggregati sono in soluzione e hanno la dimensione adatta per entrare in risonanza con l'eccitatrice massimizzando in questo modo il segnale. Raggiunto il picco di intensità inizia a questo punto il secondo stadio, il quale presenta un progressivo decremento del segnale, imputabile alla formazione di aggregati troppo grossi che si portano inevitabilmente sul fondo della soluzione uscendo dal volume di scattering. A testimonianza di ciò al termine delle misure risultano visibili ad occhio nudo gli aggregati formati sul fondo del capillare analizzato, i quali lasciano limpida la fase soprannatante all'interno della quale è localizzato il volume di misura.

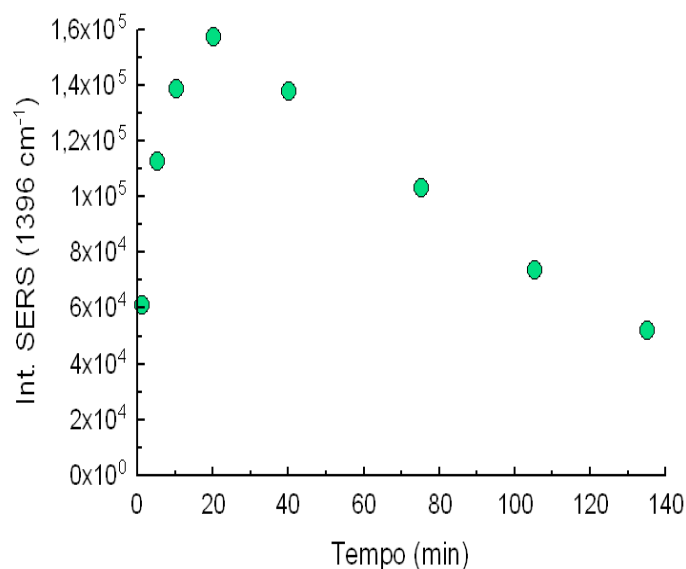


Figura 17. Evoluzione temporale del SERS della malachite-green relativa agli spettri di figura 15. La banda presa come riferimento è quella a 1396 cm⁻¹.

Avendo indagato la riproducibilità del SERS in soluzione acquosa con l'aggiunta di NaCl utilizzando la malachite-green, si è deciso successivamente di continuare lo studio di riproducibilità anche per semplice concentrazione del colloide utilizzando l'apomorfina. Le prove sono state effettuate utilizzando il colloide ottenuto tramite seed-solution dopo averlo concentrato 20 volte tramite centrifuga, e si è scelto di utilizzare un laser con eccitatrice a 457 nm per sfruttare la risonanza plasmonica del colloide.

L'analisi è stata condotta aggiungendo ad una soluzione di Apofin[®] 10⁻⁷ M qualche goccia del colloide, cercando di evitare quindi un processo di aggregazione simile a quello che si ha con l'aggiunta del sale. Il tubetto contenente la soluzione è stato analizzato 12 volte mantenendo lo spot del laser focalizzato sempre nello stesso punto e gli spettri sono stati registrati ad intervalli regolari di circa 2 minuti. In figura 18 sono riportati i 12 spettri registrati al termine di tale analisi.

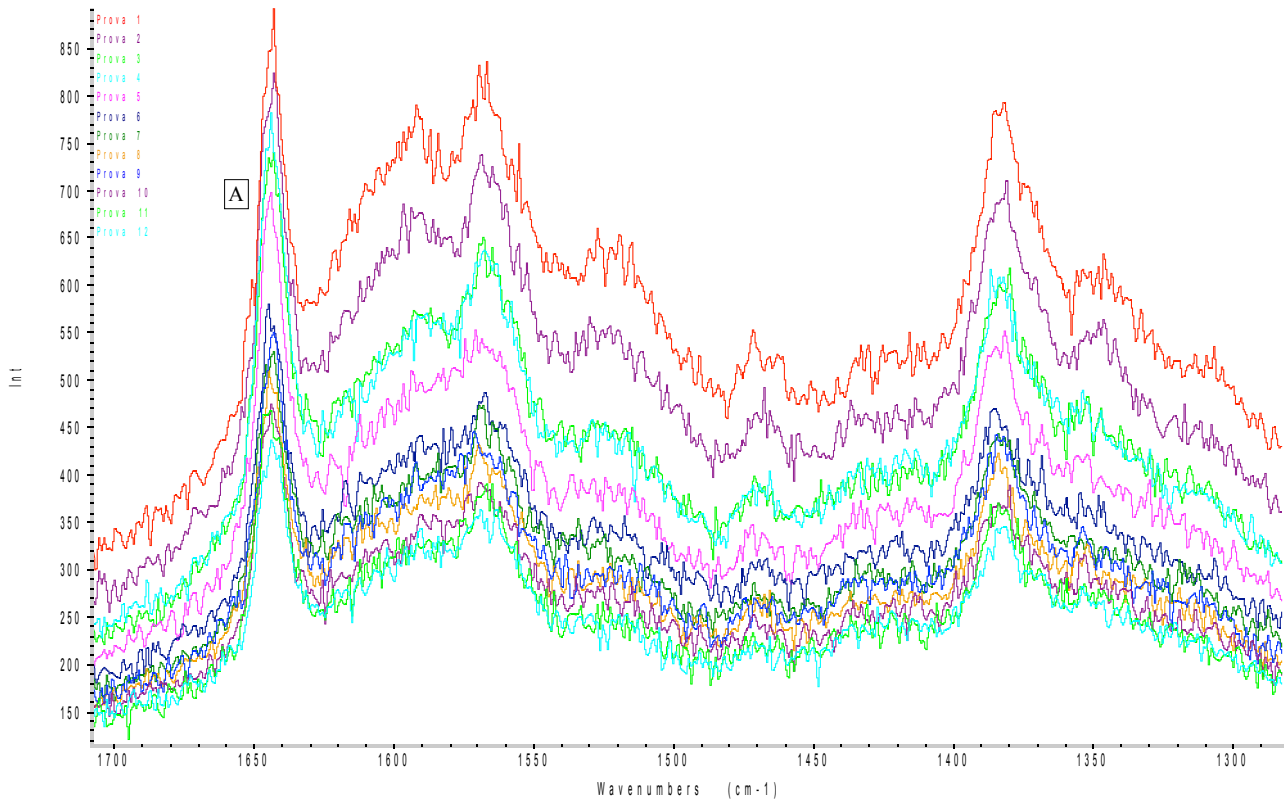


Figura 18. Spettri dell'Apofin® ottenuti con colloide seed concentrato 20 volte, registrati con eccitatrice a 457 nm.

Riportando ora le intensità dei picchi a 1643 cm^{-1} (banda A) in termini sia assoluti che relativi in funzione del numero della prova eseguita è possibile notare, oltre alle caratteristiche fluttuazioni del segnale già mostrate in precedenza, un complessivo andamento decrescente dei segnali in entrambi i casi (figura 19).

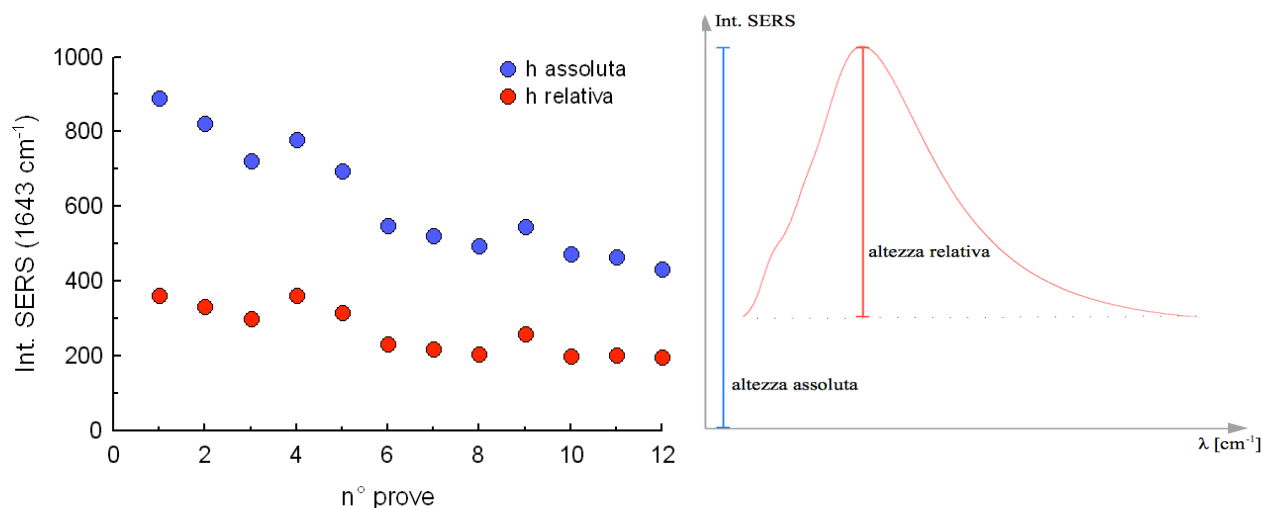


Figura 19. A sinistra andamenti delle intensità assolute e relative per le bande a 1643 cm^{-1} dell'Apofin[®] in funzione del numero della prova effettuata. Il valore medio delle intensità assolute è $616,5\text{ u.a.}$ e la deviazione standard percentuale σ risulta del $25,5\%$. Le intensità relative invece presentano un valore medio di 266 con una deviazione standard del $24,6\%$. A sinistra si vuole dare una giustificazione dei termini *assoluti* e *relativi*: per *altezza relativa* si intende l'altezza di un picco rispetto alla sua linea di base (tratteggiata), mentre per *altezza assoluta* il valore massimo dell'intensità SERS di un picco misurato rispetto alla scala delle ordinate dello spettro.

Poiché le prove sono state effettuate ad intervalli temporali costanti è possibile leggere il grafico anche in funzione del tempo. Ciò permette di pensare che anche in questo caso, pur non avendo aggiunto il sale, si sia indotto in qualche modo un processo di aggregazione all'interno della soluzione che abbia portato ad un progressivo abbassamento del segnale nel corso di tutte le prove. Le molecole di apomorfina infatti, seppur presenti in bassissime concentrazioni, possono aver giocato un ruolo importante nel promuovere un'aggregazione anche solo parziale del colloide dal momento che, in maniera analoga agli ioni Cl^- del sale, presentano anch'esse come controione il Cl^- . Occorre ricordare inoltre che questo colloide ottenuto tramite seed-solution, prima di essere concentrato 20 volte tramite centrifugazione, è stato sintetizzato con una concentrazione 4 volte superiore rispetto a quelle usuali indicate da Lee-Meisel (1982), rendendolo in questo modo già intrinsecamente meno stabile.

5.6 Rilevazione di analiti su substrati solidi

I substrati di vetro al di sopra dei quali sono state immobilizzate nanoparticelle di oro e argento si presentano come una valida alternativa per eseguire misure SERS rispetto ai colloidali. Tali substrati infatti sono in grado di fornire enhancement paragonabili a quelli delle fasi acquose e non necessitano di procedure di aggregazione o concentrazione delle nanoparticelle per effettuare le misure. D'altra parte la modalità attraverso cui si raggiunge l'immobilizzazione delle particelle è

piuttosto complessa (*cfr. paragrafo 4.5*), prevedendo, oltre a step accurati di pulizia, un vero e proprio processo di silanizzazione della superficie prima della fase di immobilizzazione vera e propria. I vetrini che hanno subito tale processo, nonostante siano stati risciacquati accuratamente al fine di eliminare i residui dell'agente immobilizzante in grado di dare aggregazione, si presentano con superfici piuttosto irregolari, mostrando in alcuni punti la formazione di cluster di nanoparticelle. Tuttavia questo effetto di complessiva disomogeneità del substrato non gioca a sfavore dell'effetto SERS bensì lo esalta, in quanto sarà proprio al di sopra dei cluster che si potranno ottenere le maggiori intensificazioni. Queste zone infatti presentano una superficie fortemente nanostrutturata ed un'elevata presenza di hot-spots in grado di massimizzare il segnale. Oltre alla presenza di cluster la superficie immobilizzata di solito si trova ad essere coperta da uno o più layer di nanoparticelle i quali sono anch'essi in grado di dare segnale e permettere la rilevazione di analiti, anche se in misura meno marcata rispetto agli aggregati.

Come nel caso delle misure in soluzione acquosa e contrariamente a quanto ci si aspetterebbe, anche con i substrati solidi si presenta il fenomeno dell'oscillazione del segnale. È possibile infatti che, effettuando una serie di acquisizioni su un particolare punto del campione e mantenendo lo spot del laser fermo, gli spettri registrati presentino variazioni significative sia delle loro intensità assolute sia dei rapporti relativi fra le bande, i quali però naturalmente non possono essere più imputati ai moti browniani presenti in fase acquosa. Il fenomeno deve essere invece spiegato considerando due aspetti fondamentali del sistema analizzato.

Il primo è relativo al substrato stesso, la cui superficie nanostrutturata può subire delle modificazioni a livello di rugosità superficiale ad opera delle elevate intensità del laser impiegato, le quali sono esaltate dagli enhancement dei campi elettromagnetici locali in corrispondenza delle strutture frattali. Essendo quindi l'innalzamento strettamente dipendente dalla nanostruttura è facile comprendere come una lieve variazione del profilo responsabile del segnale si rifletta in una variazione dell'intensità registrata.

Il secondo aspetto, certamente il più importante, è invece legato alle variazioni della disposizione dell'analita durante la misura o alle variazioni della sua struttura chimica. La molecola può subire infatti tutta una serie di processi che portano a cambiare la sua disposizione rispetto alla nanostruttura a cui è legata, come ad esempio riorientazioni, oppure reazioni fotochimiche indotte dal laser, processi di diffusione e di desorbimento o semplicemente la rottura dei suoi legami chimici. Anche in questo caso si produrranno fluttuazioni del segnale descrivibili come variazione dei rapporti di intensità fra le bande (riorientazioni) o diminuzioni imputabili alla degradazione.

5.6.1 Detezione del 2-naftalentiolo

Fatte queste premesse sulla natura delle misure di mapping si vogliono ora presentare le misure ottenute con la molecola modello, che è in questo caso è il 2-naftalentiolo. Per l'adsorbimento superficiale dell'analita sulla superficie nanostrutturata è stata preparata una soluzione 10^{-5} M della molecola in etanolo. Successivamente in una camera da 6 litri sono stati inseriti 0,1 ml della soluzione e lasciati evaporare. Assumendo per l'aria una densità a 25 °C e 1 atm pari a $1,184 \text{ kg/m}^3$ e un peso molecolare medio di $28,964 \text{ g/mol}$, (considerando il numero di Avogadro $N_A = 6,022 \cdot 10^{23}$ necessario per la conversione dei grammi in moli) la concentrazione di 2-naftalentiolo, rispetto alle molecole che costituiscono l'aria e a quelle di etanolo, risulta pari a circa 4 ppb (parti per miliardo). Tale valore di concentrazione è sufficientemente basso da essere sicuri che l'eventuale detezione dei segnali della molecola siano dovuti solamente all'effetto SERS e non al semplice scattering Raman. Dopo aver aspettato un tempo sufficiente alla completa evaporazione della soluzione contenente l'analita e a una sua completa distribuzione all'interno della camera in fase gas, si è proceduto ad analizzare i vetrini posti precedentemente all'interno della camera stessa. Come si può vedere dalla figura 20, che mostra il primo di una serie di substrati di argento analizzati, la superficie presenta una fascia di aggregati di nanoparticelle, mentre il resto della superficie è ricoperto in maniera uniforme da vari layer di nanoparticelle. Poiché, come già anticipato, sono quelle corrispondenti alle zone aggregate le porzioni in grado di fornire il maggiore enhancement, si è deciso di effettuare un mapping di tipo lineare a cavallo di questa zona, in modo da verificare se effettivamente l'aggregazione delle nanoparticelle si traduce in un aumento del segnale.

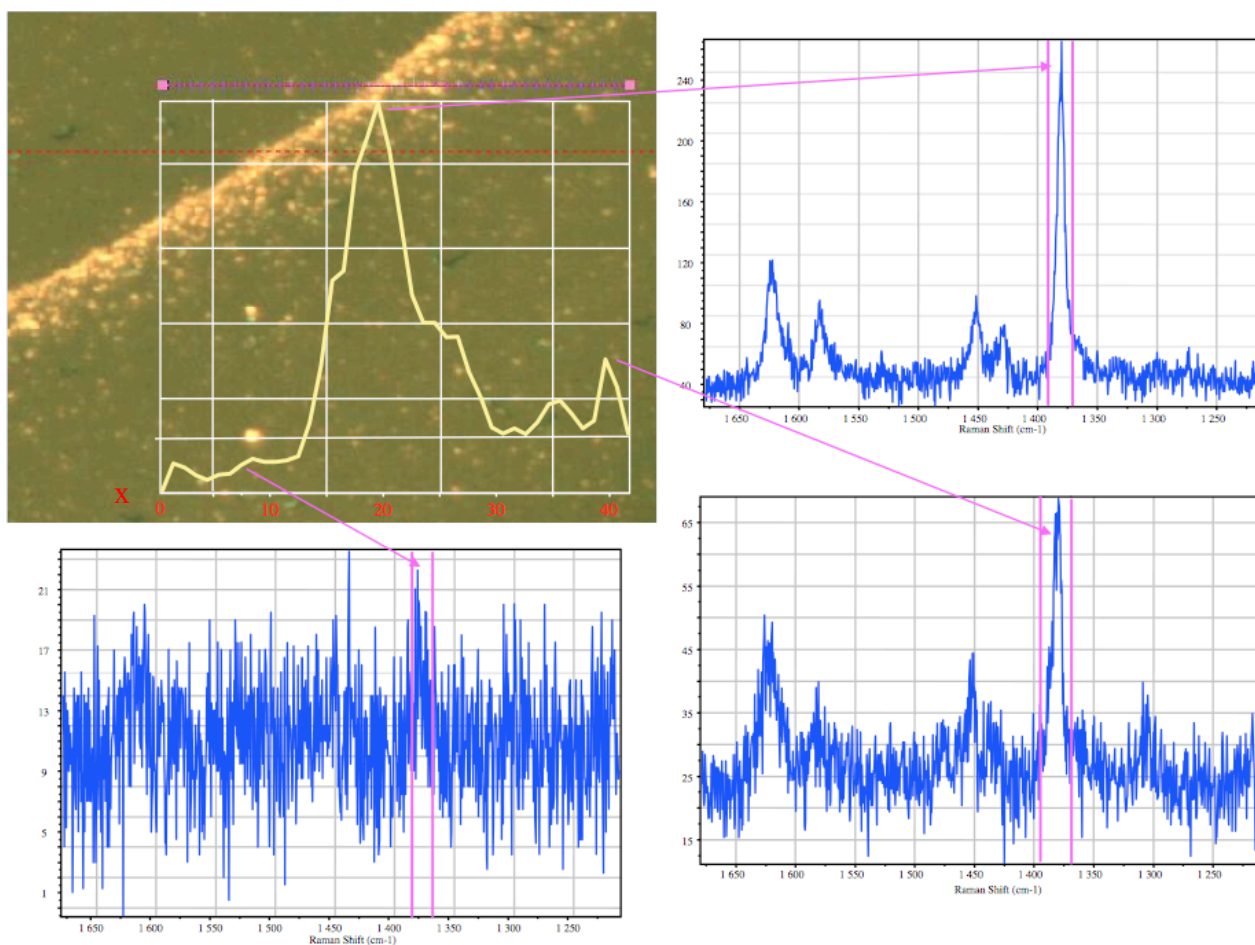


Figura 20. Mapping 1D del 2-naftalentiolo (4 ppb) adsorbito su vetrino con nanoparticelle di argento immobilizzate con MPTMS. Laser utilizzato 514 nm; banda di riferimento per la detezione 1378 cm^{-1} .

In alto a sinistra è riportata l'immagine al microscopio ottico della superficie di analisi, con la linea in rosa ad indicare l'esatto percorso mappato con tecnica Raman, mentre sotto è stato posto un grafico del segnale registrato per la banda 1378 cm^{-1} (presa a riferimento per la detezione della molecola) in funzione della coordinata di spostamento x lungo il segmento orizzontale mostrato nell'immagine, pari a circa 40 μm . Tra tutti i punti analizzati ne sono stati scelti 3 significativi, i cui spettri sono mostrati ai lati dell'immagine. Considerando lo spettro registrato poco al di sotto di $x = 10 \mu\text{m}$, si nota che la banda di riferimento dà un segnale quasi impercettibile, a testimonianza del fatto che i layer uniformi non forniscono grandi innalzamento del segnale, in quanto le superfici regolari non sono caratterizzate da elevata presenza di hot-spots. Quando però il laser arriva ad analizzare la zona in prossimità della fascia di nanoparticelle aggregate ($x = 20 \mu\text{m}$) si assiste ad un repentino aumento delle intensità dei segnali, con la banda a 1378 cm^{-1} che risulta ben visibile e piuttosto intensa. Oltrepassata questa zona si nota una diminuzione del segnale, che aumenta leggermente verso la fine della scansione: a circa 40 μm infatti c'è un lieve aumento del SERS in

corrispondenza di un piccolo aggregato illuminato dal laser che, sebbene fornisca un segnale circa 4 volte minore di quello registrato precedentemente, permette tuttavia anche in questo caso un riconoscimento della molecola, con la banda di riferimento che comunque risulta nettamente più intensa del rumore.

Dimostrata quindi la possibilità di analizzare la molecola campione su un di substrato solido e l'ottenimento di segnali riconducibili alla stessa, si è deciso in seguito di testare i substrati eseguendo al di sopra di essi dei mapping bidimensionali, i quali come output della misura forniscono una regione delle stesse dimensioni di quella mappata in una scala di colori (in questo caso il rosso), dove le sfumature, partendo da quelle più scure per arrivare a quelle più chiare, indicano la presenza di segnali via via crescenti.

In figura 21 si riportano i risultati di tale analisi, dove il rettangolo in rosa nella foto a destra indica la zona del substrato effettivamente mappata, mentre a lato è mostrato l'output dei segnali registrati, che come detto è bidimensionale, con la scala di colore “tarata” sempre sulla banda di riferimento della molecola a 1378 cm^{-1} . Dalla figura si nota che in questo caso, a differenza di quello precedente, si è deciso di mappare una zona relativamente uniforme, in modo da capire quali siano le fluttuazioni dei segnali registrati in corrispondenza di zone che mostrano maggiori caratteristiche di uniformità rispetto alle altre. Bisogna sottolineare che in questo caso, e anche per gli altri mapping bidimensionali mostrati successivamente, le scale di colori che indicano la presenza o meno del segnale della banda di riferimento della molecola sono sempre registrati con una scala relativa e mai assoluta. Per questo motivo è possibile confrontare solamente sfumature di colore provenienti dalla stessa analisi (cioè all'interno della stessa zona analizzata) ma non quelle provenienti da analisi diverse.

Dall'output complessivo della misura sono stati scelti due spettri, uno relativo ad un pixel con elevata intensità (rosso) e uno con una tonalità meno intensa del precedente. In particolare il primo spettro, come era deducibile già guardando l'intensità dei rispettivi pixel, mostra un'intensità nettamente superiore rispetto all'altro, con una variazione tra i due picchi di riferimento di circa il 70%. Poiché inoltre si nota la presenza di altri pixel più scuri all'interno della zona mappata si conclude che le fluttuazioni dei segnali saranno anche molto più consistenti del 70%, dimostrando come una misura affidabile della concentrazione della molecola adsorbita sia difficile, in quanto le rette di taratura che dovrebbero essere prese come riferimento avrebbero delle incertezze enormi rispetto ai segnali registrati, a meno di fare delle medie spaziali sufficientemente estese.

Sempre dal confronto tra i due spettri della figura 21 si notano variazioni di intensità relative fra le bande della molecola, con lo spettro più intenso che mostra un numero maggiore di bande.

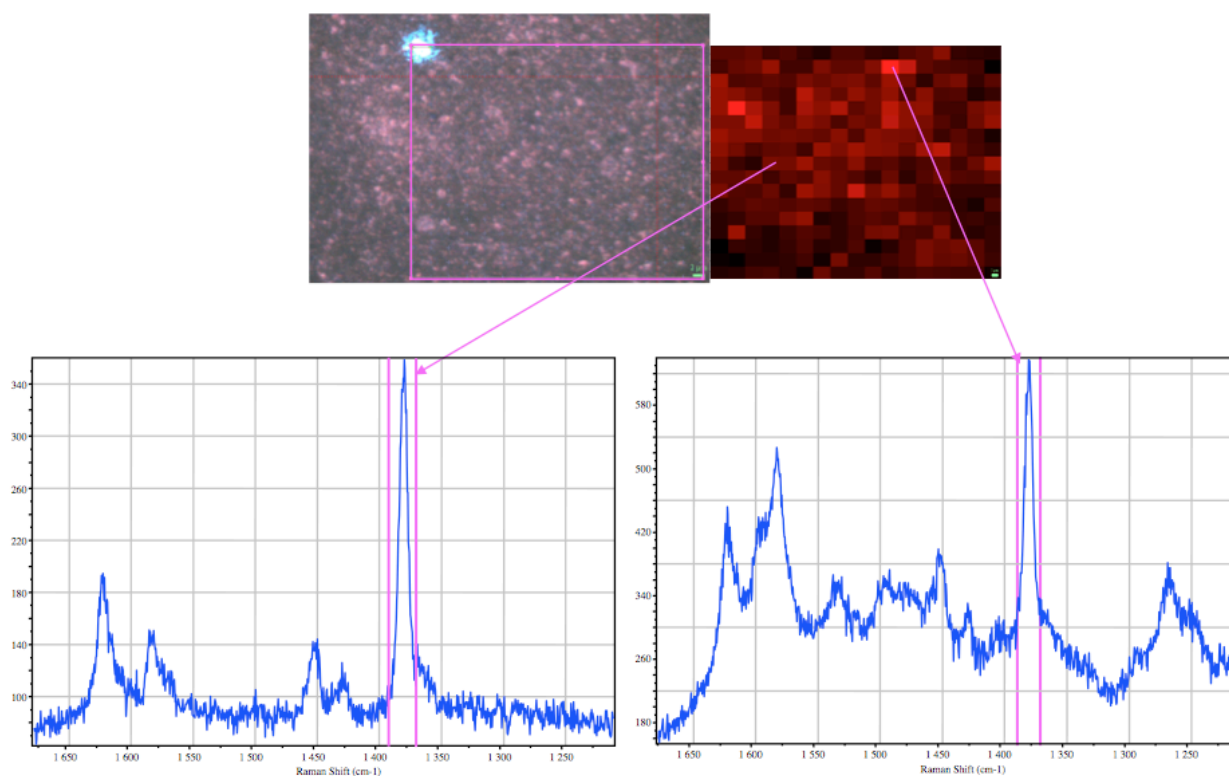


Figura 21. Mapping 2D del 2-naftalentiolo (4 ppb) adsorbito su vetrino con nanoparticelle di argento immobilizzate con MPTMS. Laser utilizzato 514 nm; banda di riferimento per la detezione 1378 cm^{-1} . Nella fotografia in alto a sinistra si nota lo spot del laser prima della sua focalizzazione.

5.6.2 Rilevazione dell'apomorfina

Dai risultati ottenuti dalla detezione del 2-naftalentiolo si è passati alle analisi della molecola effettivamente di interesse e oggetto di studio, cioè l'apomorfina.

La prima analisi che si vuole mostrare ricalca a grandi linee le misure già riportate in figura 20. Si è cercato di ottenere la detezione dell'apomorfina attraverso un mapping monodimensionale, cercando un punto di discontinuità tale da permettere un forte innalzamento del segnale rispetto ad un fondo debole o anche nullo. In questo caso per promuovere l'adsorbimento dell'analita sulla superficie nanostrutturata si è diluita una soluzione di Apofin[®] in acqua deionizzata fino ad arrivare ad una concentrazione di 10^{-8} M e in questa soluzione è stato immerso il substrato da analizzare per una decina di minuti, in modo da rendere possibile un'interazione sufficientemente lunga tra substrato e molecola tale da promuovere un adsorbimento sufficiente di quest'ultima. In seguito il substrato è stato estratto dalla soluzione e lasciato asciugare. Questa procedura è stata utilizzata in tutti gli altri casi che riguardano i mapping SERS dell'apomorfina.

Per il riconoscimento della molecola di apomorfina si è scelto in questo caso di utilizzare come riferimento la banda D posta a circa 1520 cm^{-1} (cfr. tabella 1 e figura 5, paragrafo 5.2). I risultati

dell'analisi sono riportati in figura 22, dove sono mostrati due spettri relativi a due particolari punti di interesse analizzati. Come nel caso dell'analisi riportata in figura 20, la zona mappata è quella indicata dalla linea di colore rosa: al di sotto di essa è riportato un grafico del segnale della banda D dell'apomorfina in corrispondenza del punto analizzato. In questo caso si è deciso di effettuare il mapping proprio a cavallo di un'estremità del vetrino, raggiunta la superficie del quale si incontra un aggregato. Come è mostrato dalla fotografia al microscopio ottico l'estremità del vetrino è posta appena dopo i 12 μm dall'origine dell'asse x: non a caso infatti gli spettri registrati per $0 < x < 12 \mu\text{m}$ danno segnali nulli, come mostrato dallo spettro a sinistra. Oltrepastato $x = 12 \mu\text{m}$ però si assiste ad un incremento del segnale della banda D che raggiunge un massimo a circa 20 μm , a livello cioè di un particolare punto dell'aggregato in grado di fornire elevato innalzamento del segnale (spettro a destra). Dopo il valore del massimo, per $x > 20 \mu\text{m}$, si nota dal grafico che il segnale rimane sempre piuttosto elevato, a dimostrazione del fatto che in generale tutta la porzione ricoperta dall'aggregato riesce a dare un enhancement tale da permettere di riconoscere la molecola.

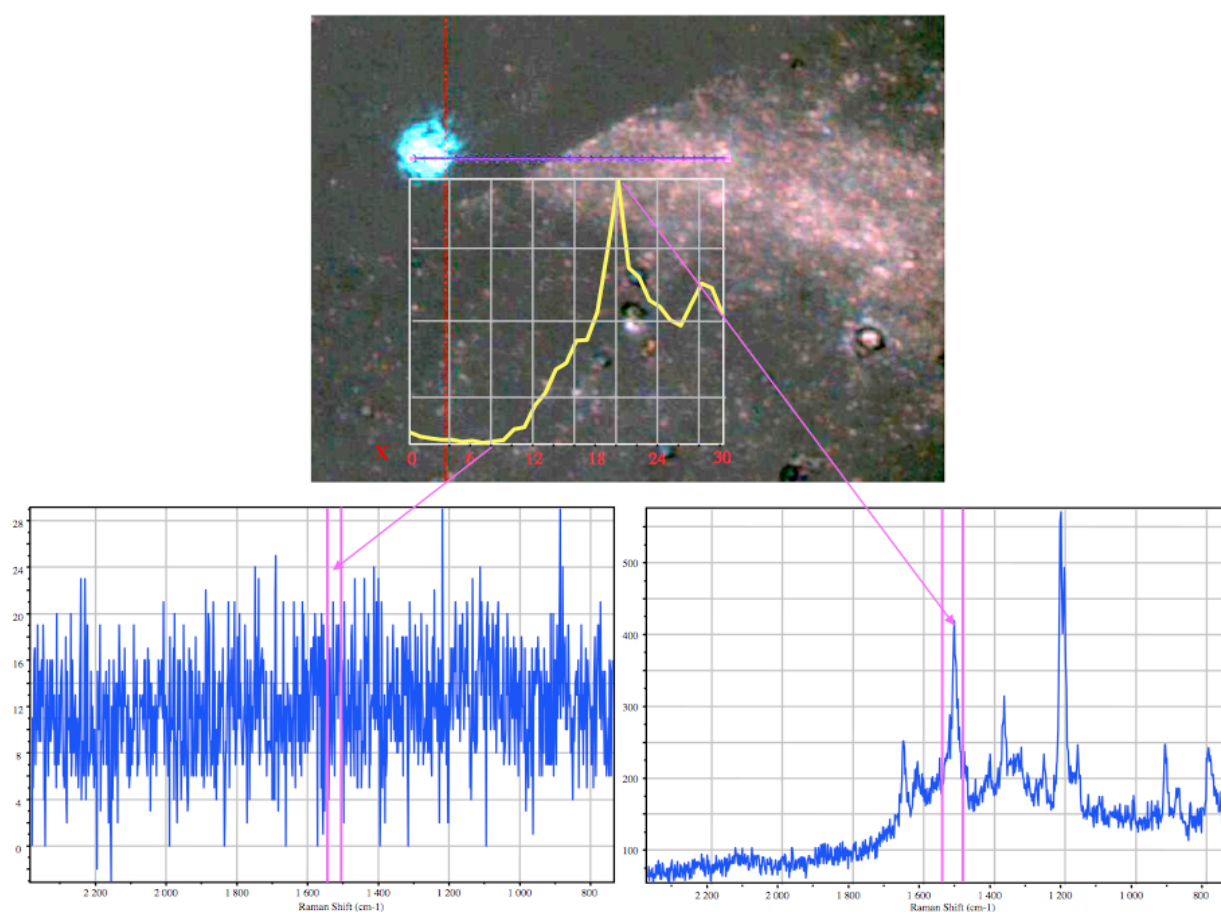


Figura 22. Mapping 1D dell'apomorfina 10^{-8} M adsorbita su vetrino con nanoparticelle di argento immobilizzate con MPTMS. Laser utilizzato 514 nm; la banda di riferimento usata per la detezione è la D (1520 cm^{-1} circa).

Passando alle analisi condotte su substrati di oro occorre dire innanzitutto che la detezione della molecola al di sopra di questi substrati si è mostrata in generale più difficoltosa rispetto al caso dell'argento. Considerando infatti i limiti di detezione a cui si è giunti bisogna dire che essi sono più elevati (2/3 ordini di grandezza) di quelli mostrati finora per i substrati di argento.

Inoltre le analisi con substrati di oro hanno richiesto un cambiamento della lunghezza d'onda del laser: si è passati infatti dai 514 nm delle analisi precedenti ai 785 nm, in quanto solo attraverso una lunghezza d'onda di questo tipo si è riusciti ad entrare effettivamente in risonanza e ottenere segnali registrabili. Questo spostamento dell'eccitatrice a più elevate lunghezze d'onda è dovuto principalmente a due ragioni. La prima è connessa al fatto che l'oro presenta al di sotto dei 600 nm un valore della parte immaginaria della costante dielettrica molto elevato (*cfr. figura 2, paragrafo 2.3*), responsabile sia di elevate dissipazioni di energia elettromagnetica sia di forti valori di assorbimento, che quindi abbassano moltissimo i segnali rilevabili. La seconda è dovuta alle lunghezze d'onda caratteristiche dei plasmoni di questo metallo, che a differenza di quelli di oro si trovano di solito ben al di sopra i 500 nm. Queste nanoparticelle di oro, che durante il processo di immobilizzazione su vetro possono aggregare in maniera analoga a quelle di argento, proprio in virtù dell'aggregazione sposteranno ulteriormente il loro plasmone a lunghezze d'onda maggiori.

In definitiva il primo fenomeno rende impossibile utilizzare un laser a 514 nm, mentre il secondo aumenta la risonanza verso lunghezze d'onda più elevate: l'utilizzo del laser a 785 nm si è presentato in pratica come una scelta obbligata.

In figura 23 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi, che ha previsto la detezione dell'apomorfina a partire da una soluzione di Apofin[®] $8 \cdot 10^{-5}$ M su un substrato di nanoparticelle di oro immobilizzate con MPTMS. Anche in questo caso si è deciso di mappare una zona a cavallo di un aggregato al fine di evidenziare l'intensificazione dovuta alla sua presenza. Come si osserva dalla fotografia la forma dell'aggregato è particolare, in quanto presenta una piccola protuberanza per $x > 8 \mu\text{m}$, la cui presenza viene puntualmente registrata attraverso un piccolo innalzamento del segnale della banda D. Successivamente l'aumento del segnale si traduce in un picco per $x > 16 \mu\text{m}$. Inoltre in tutta la zona relativa all'aggregato si hanno sempre segnali piuttosto elevati. Oltrepassato il cluster il segnale subisce un rapido decremento e gli spettri che si registrano forniscono, come all'inizio della misura, il segnale del solo vetro. Ciò significa che i layer di nanoparticelle di oro depositate su vetro non danno un effetto SERS sufficiente per la detezione della molecola, a differenza di quelli di argento che riuscivano a dare segnale già a concentrazioni di analita mille volte inferiori.

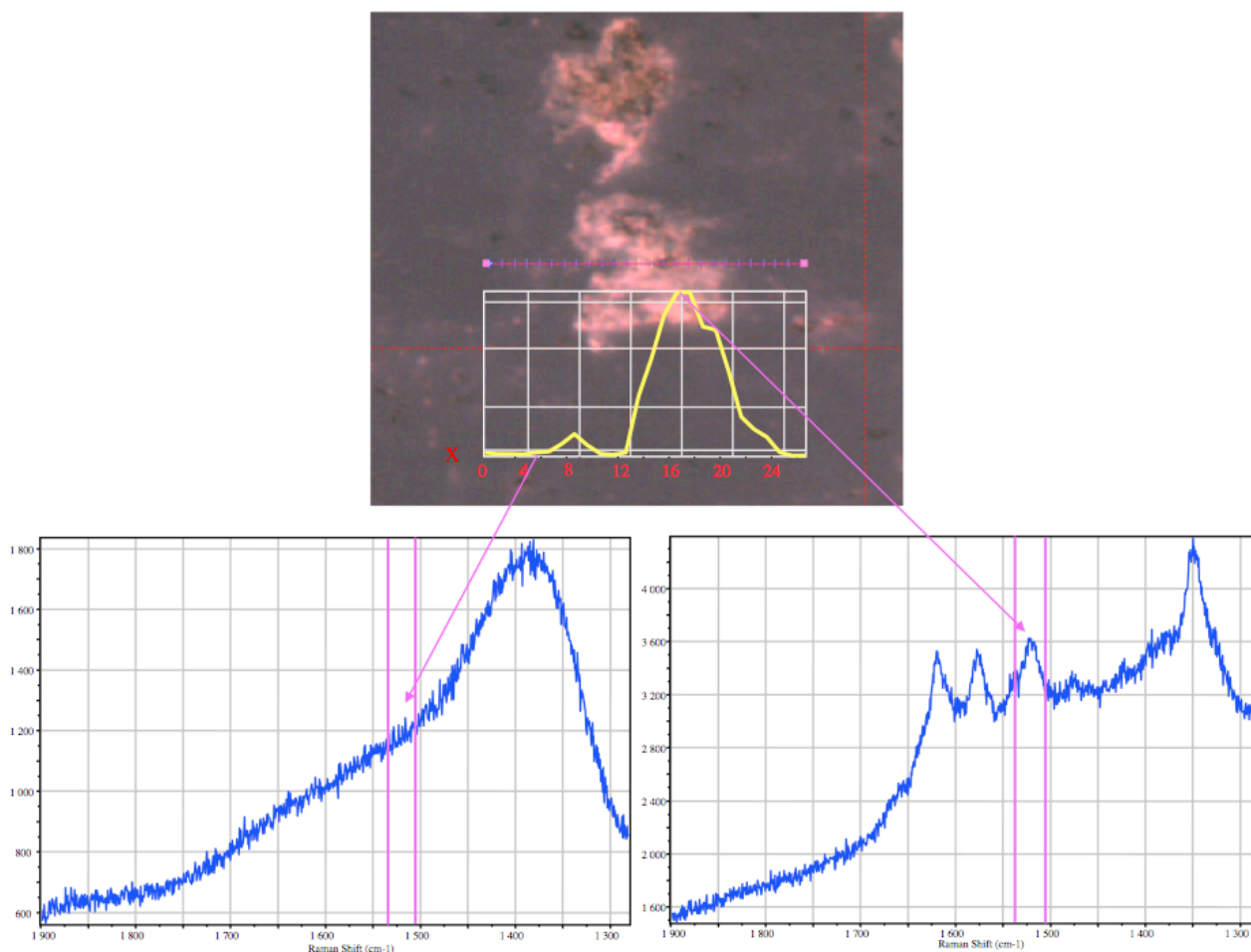


Figura 23. Mapping 1D dell'apomorfina $8 \cdot 10^{-5}$ M su vetrino con nanoparticelle di oro immobilizzate con MPTMS. Eccitatrice laser a 785 nm; la banda di riferimento usata per la detezone è la D (1520 cm^{-1} circa).

Per quanto riguarda invece i mapping bidimensionali dell'apomorfina (analogamente al caso del 2-naftalentiolo) si è voluto effettuare un'analisi su una zona che presentasse buone proprietà di uniformità a livello del substrato. La superficie è stata mappata di proposito scegliendo il laser a 785 nm, per vedere se fosse possibile la detezone della molecola anche con la lunghezza d'onda impiegata di solito per l'oro.

In figura 24 sono riportate la foto della zona mappata e due spettri relativi ad altrettanti punti analizzati. Nella foto si nota la griglia che definisce tutti i punti di analisi SERS, mentre a fianco è riportato l'output dei segnali in scala di colore (rosso). Si ricorda che il segnale relativo alla banda D della molecola è proporzionale all'intensità della sfumatura di rosso associata. Il grafico a sinistra, relativo ad un pixel molto intenso, presenta elevate intensità SERS e nel complesso fornisce uno spettro molto dettagliato dell'apomorfina. Passando invece ad un altro pixel meno intenso si nota un forte decremento del segnale relativo alla banda D e in generale la perdita dei segnali di quasi tutte le altre bande: passando dall'uno all'altro spettro il segnale della banda D diminuisce di quasi tre

volte, a dimostrazione del fatto che anche su substrati che mostrano al microscopio buona uniformità, non è possibile eseguire in pratica analisi quantitative che diano una stima accurata della quantità di analita adsorbito sul vetrino, a meno di effettuare medie spaziali su regioni sufficientemente estese.

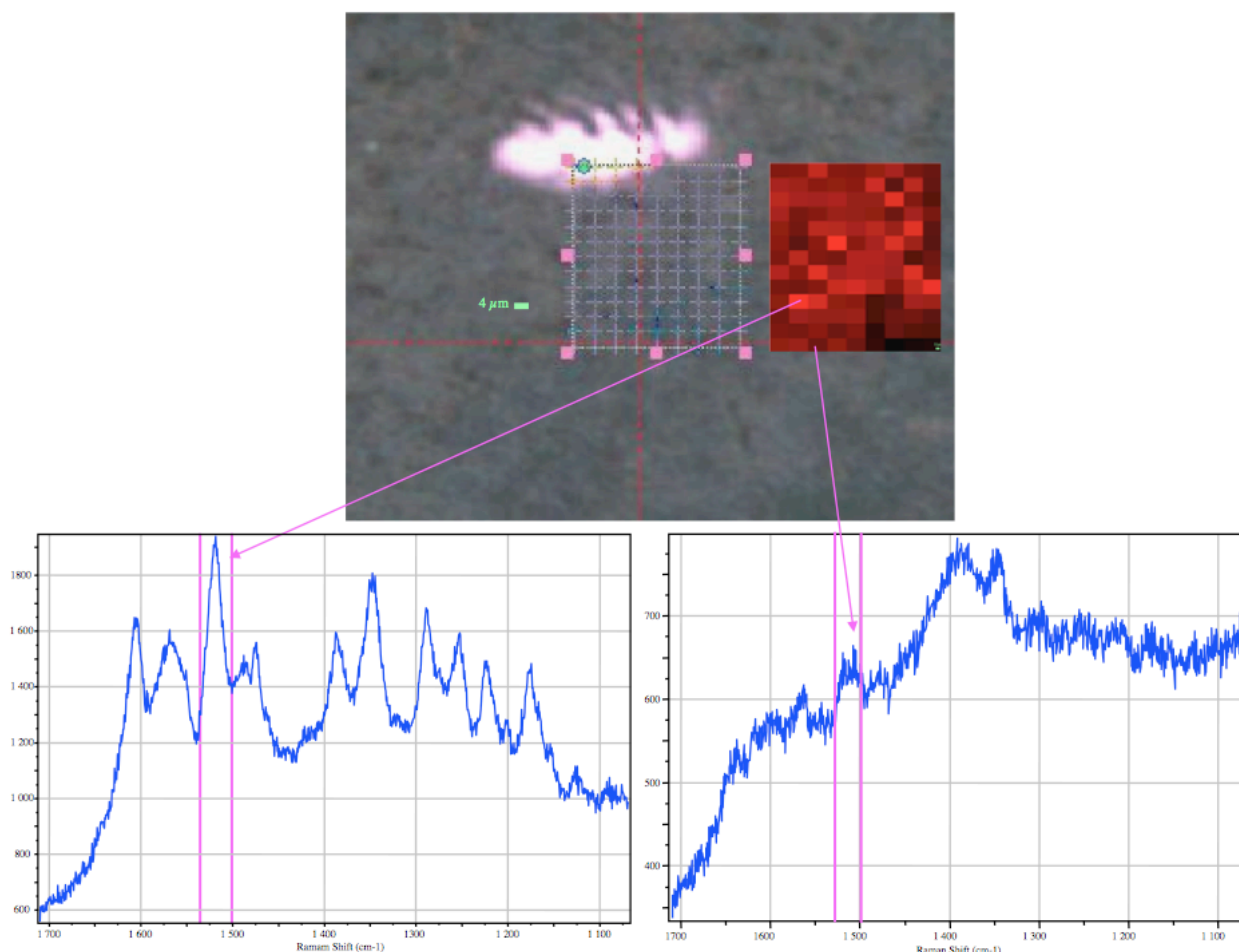


Figura 24. Mapping 2D dell'apomorfina 10^{-8} M su vetrino con nanoparticelle di argento immobilizzate con MPTMS. Laser utilizzato 785 nm; la banda di riferimento utilizzata per la detezione è la D (1520 cm^{-1} circa).

Dai risultati di figura 24 quindi si conclude che anche con un laser a 785 nm è possibile registrare i segnali della molecola in maniera accurata.

Nel corso delle analisi fin qui trattate è stato possibile mostrare come le superfici dei substrati siano di solito disuniformi e irregolari. Oltre all'alternanza fra zone ricoperte con deposizione uniforme di nanoparticelle e cluster delle stesse, si possono trovare zone ricoperte da un numero di layer diverso fra loro, come mostrato in figura 25 dove si riporta la fotografia di un vetrino ricoperto da nanoparticelle di oro immobilizzate con APTMS. Dalla fotografia si nota la netta alternanza fra porzioni ricoperte in misura diversa, dove le più scure sembrano essere caratterizzate da un numero

minore di layer che coprono le relative aree. Impostando un mapping sufficientemente esteso da comprendere le varie zone, tra cui una al di fuori del vetrino analizzato, si è voluto verificare se effettivamente la presenza di zone ricoperte da un numero diverso di strati fornisce segnali differenti, e quale fosse la differenza relativa alle due zone.

In figura 25 si mostra nell'output in scala di rossi che la misura SERS è sensibile a questo tipo di variazione. In particolare si nota una netta differenza nella scala delle sfumature al passaggio dalla zona più scura a quella più chiara. In pratica la sovrapposizione dell'immagine in scala di rossi sulla zona definita dal quadrato in rosa porterebbe a far combaciare le rispettive zone scure e chiare. La striscia più chiara fornisce segnali nettamente più intensi delle zone scure che la circondano, e l'aumento dell'intensità relativo alla banda D dell'apomorfinina è di circa un ordine di grandezza, come mostrato dal confronto tra gli spettri posti in basso. Per quanto riguarda la zona in nero in alto (e quindi a fondo scala) essa non dà alcun segnale della banda di riferimento, e lo spettro relativo mostra consistentemente solo rumore.

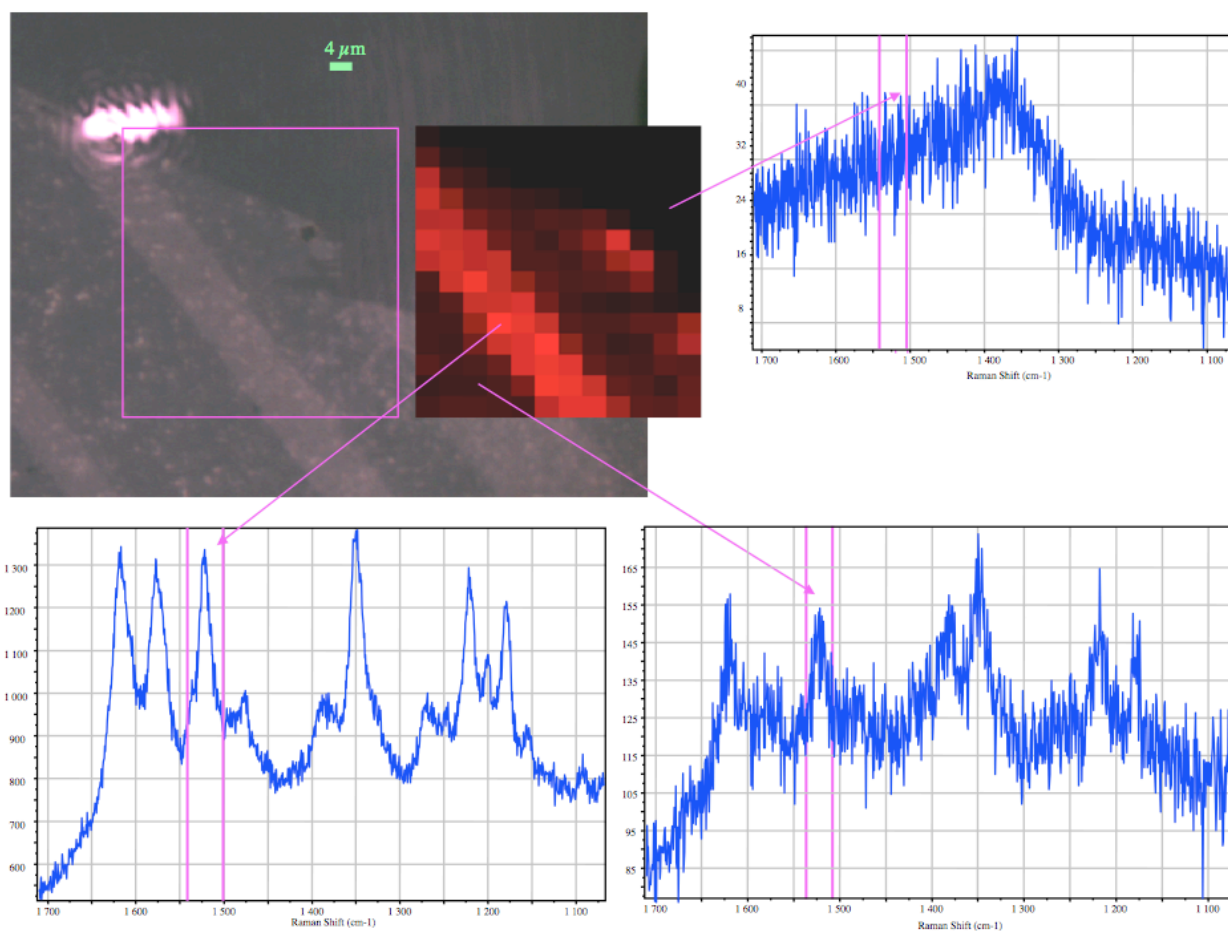


Figura 25. Mapping 2D dell'apomorfinina 10^{-4} M su vetrino con nanoparticelle di oro immobilizzate con APTMS. Laser utilizzato 785 nm. La banda presa come riferimento per la deteazione è la D (1520 cm^{-1} circa).

Dall'analisi quindi si conclude che, essendo il segnale della zona più chiara nettamente maggiore di quello registrato ai lati, la zona al centro dovrebbe essere quella ricoperta da un maggiore numero di layer, responsabili del segnale SERS osservato.

Poiché un campione di questo tipo si è mostrato molto interessante per la sua risposta SERS, è stata compiuta in seguito un'ulteriore analisi di mapping più approfondita in una zona sottostante a quella precedente, i cui risultati vengono riportati in figura 26. Il maggiore numero di punti soggetti a misura forniscono da una parte una mappa più dettagliata rispetto alla misura precedente ma dall'altra non fanno che confermare le conclusioni già tratte. Nella mappa si ritrova ancora la striscia più chiara e le sfumature di rossi ricalcano esattamente la variazione di colore del substrato. Gli spettri relativi ai tre punti analizzati mostrano che il segnale proveniente dalla striscia è ancora di circa un ordine di grandezza più elevato rispetto a quelli provenienti dalle zone accanto, le quali, peraltro, danno intensità fra loro confrontabili.

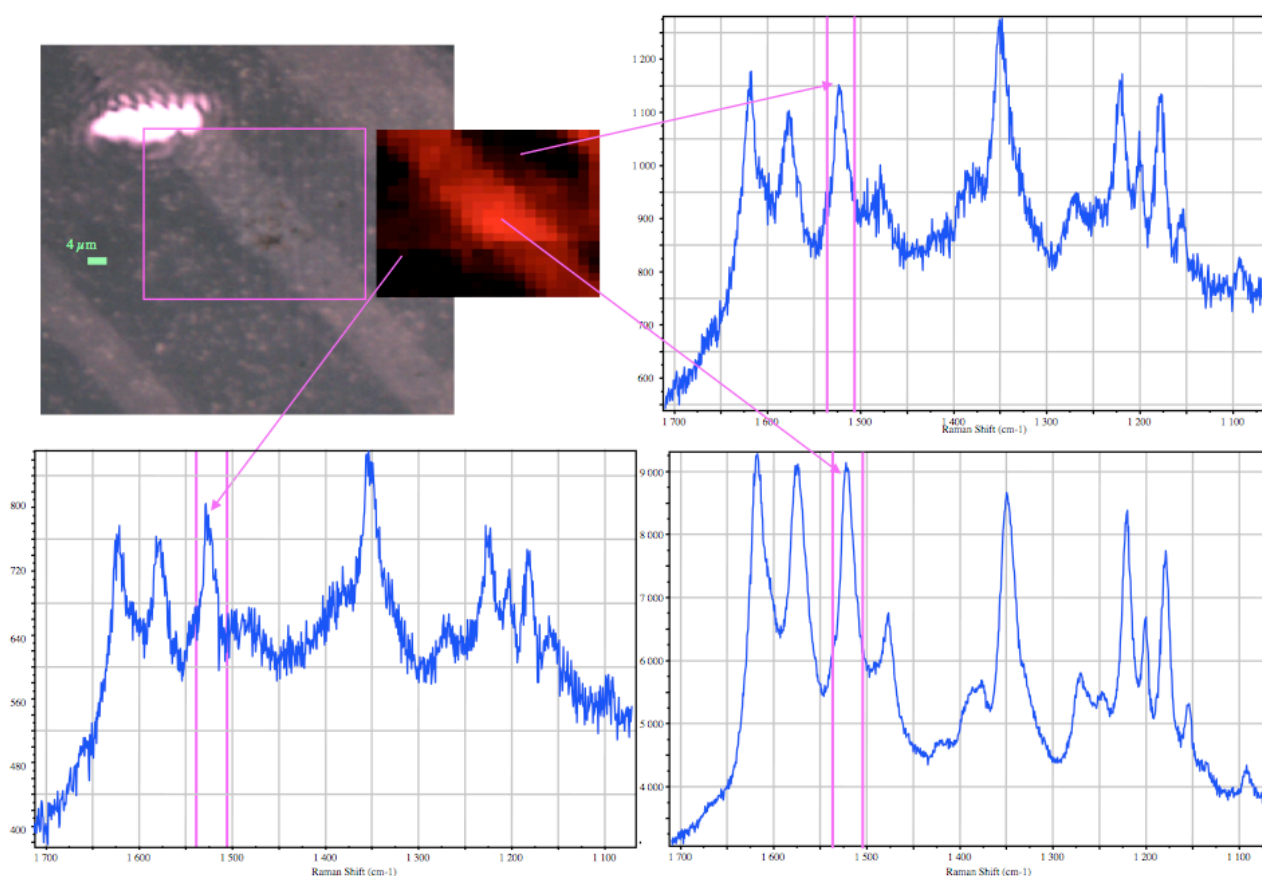


Figura 26. Mapping 2D dell'apomorfina 10^{-4} M su vetrino con nanoparticelle di oro immobilizzate con APTMS. Laser utilizzato 785 nm. La banda presa come riferimento per la detezione è la D (1520 cm^{-1} circa).

Capitolo VI

Applicazione del SERS alla deteazione dell'apomorfina

6.1 Introduzione

Nel corso dei paragrafi precedenti si è mostrata la possibilità di eseguire analisi dell'apomorfina sia in fase acquosa che su substrati solidi immobilizzati. L'obiettivo di questo capitolo invece è quello di definire un vero e proprio metodo di rilevazione di questo analita in condizioni sperimentali che si avvicinino maggiormente a quelle ipotizzabili in ambito clinico. Da ciò deriva la necessità di eseguire misure in sospensioni colloidali acquose contenenti le proteine che simulino il comportamento del plasma umano, o l'utilizzo diretto dello stesso plasma nel quale disperdere il farmaco in concentrazioni prossime a quelle terapeutiche.

La somministrazione dell'Apofin[®] (formulazione farmaceutica dell'apomorfina) avviene nella maggioranza dei casi tramite iniezioni sottocutanee, le quali sono effettuate solitamente più volte al giorno utilizzando una siringa secondo le necessità terapeutiche [LeWitt (2004)]. Tuttavia, nel corso degli ultimi anni, la sperimentazione approntata sul farmaco ha reso disponibile anche metodi di somministrazione basati sull'infusione continua all'interno del corpo del paziente [Manson (2001)]. Non a caso gli studi compiuti sul farmaco hanno riguardato infatti da una parte il comportamento cinetico nel plasma in seguito ad infusione continua [Priston (1996)], e dall'altra la comprensione delle interazioni con le proteine presenti nei tessuti [Smith (1985)]. Lo sviluppo di un metodo pratico e veloce per definire la presenza del farmaco all'interno della parte proteica del sangue, cioè il plasma, risulterebbe molto utile ed interessante, in quanto le cinetiche di assorbimento e di espulsione, direttamente collegate all'attività che svolge il farmaco stesso all'interno del corpo, non superano di solito le due ore. Con questo scopo si è scelto quindi di abbinare alle proprietà e caratteristiche del SERS il metodo della TLC (Thin Layer Chromatography), una tecnica capace di separare le varie sostanze costituenti una miscela in funzione della loro polarità.

La prima parte del capitolo sarà quindi dedicata all'illustrazione della tecnica TLC + SERS, successivamente si darà una breve descrizione della proteina impiegata per simulare il comportamento del plasma, vale a dire l'albumina. Infine saranno mostrati i risultati sperimentali ottenuti dalle analisi, che hanno previsto l'impiego del SERS al fine di raggiungere la rilevazione della molecola nelle usuali concentrazioni di somministrazione.

6.2 TLC (Thin Layer Chromatography)*

La più semplice forma di cromatografia liquida è la cromatografia su strato sottile. Essa è una tecnica estremamente semplice e veloce che consente l'analisi qualitativa dei componenti di una miscela, e trova ampia applicazione come supporto ad un gran numero di metodologie di laboratorio. Il principio su cui la tecnica si basa è la diversa affinità fra analita e substrato. La separazione tra i vari costituenti viene determinata dalle differenti interazioni delle molecole con la struttura porosa della fase stazionaria. Nella sua forma più comune, la fase stazionaria è un solido polare, mentre la fase mobile è costituita da solventi organici.

La fase stazionaria utilizzata solitamente è costituita da silice: la sua polarità è dovuta al fatto che in superficie il biossido di silicio espone sia dei legami SiO polari che dei gruppi funzionali SiOH, come mostrato in figura 1. La fase mobile invece, detta anche eluente, è costituita un solvente organico che si muove lungo la fase stazionaria per semplice capillarità.

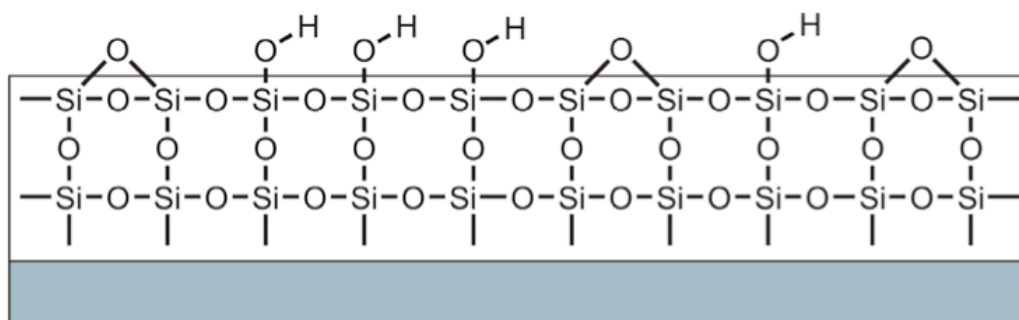


Figura 1. Substrato poroso per TLC: lo strato superiore, spesso qualche decimo di millimetro, è costituito da silice porosa mentre quello inferiore con funzione di supporto è polimerico.

La differente affinità che ciascuna sostanza organica mostra nei confronti della fase mobile e della fase stazionaria è una caratteristica intrinseca di ciascun composto organico, dipendente dalla sua polarità, dalla dimensione e dal volume della molecola. Pertanto alcune sostanze sono trascinate più rapidamente dalla fase mobile, altre più lentamente, permettendo di effettuare una completa

* Per la stesura del paragrafo 6.2 si rimanda al seguente indirizzo web:
<http://www.chimica.unipd.it/mauro.carraro/pubblica/Lezione2.pdf>

separazione dei composti costituenti la miscela lungo il substrato. Quando la fase mobile infatti risale lungo la silice, i composti in essa disciolti sono in grado di interagire con i gruppi polari della silice stessa. Le interazioni in gioco sono principalmente dipolo-dipolo e formazione di legami ad idrogeno: da ciò deriva che quanto più polari sono i composti, tanto più verranno rallentati e trattenuti dalla fase stazionaria. Un tipico set-up sperimentale prevede la deposizione sulla fase stazionaria per mezzo di un capillare delle sostanze da analizzare in soluzione diluita (figura 2).

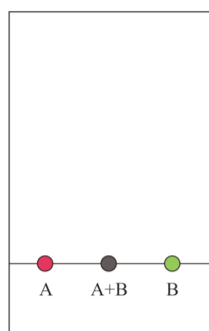


Figura 2. Deposizione su un substrato solido per TLC di sostanze pure A e B o in miscela A + B in soluzione diluita.

La lastrina viene poi immersa alla base nella fase mobile, avendo cura che il liquido non ricopra inizialmente le sostanze depositate; a questo punto la fase mobile risale lungo la fase stazionaria per capillarità trascinando con sé le sostanze disciolte (figura 3).

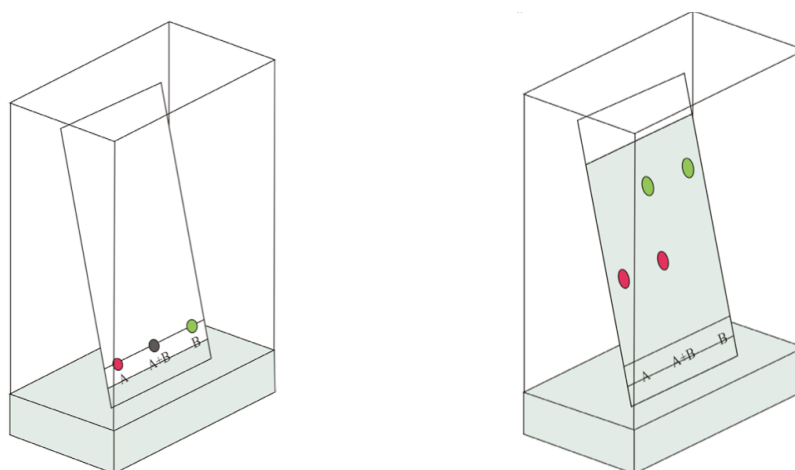


Figura 3. Immersione della fase stazionaria in quella mobile e successiva risalita dell'eluente per capillarità. La sostanza A, avendo percorso un tragitto minore di B, avrà sperimentato maggiore interazione con la silice porosa, a dimostrazione del fatto che è caratterizzata da una maggiore polarità rispetto all'altra molecola costituente la miscela.

Avendo ora ottenuto una separazione fra i due composti A e B è possibile analizzarli separatamente per mezzo ad esempio della spettroscopia Raman, riconducendo gli spettri registrati nei differenti punti alle rispettive molecole A e B in maniera univoca e senza sovrapposizioni tra segnali delle bande caratteristiche dei diversi composti.

6.3 Albumina*

L'albumina è una proteina del plasma prodotta dal fegato con peso molecolare di 69000 dalton. È contenuta anche nel latte e nell'albume dell'uovo, da cui prende il nome. Il normale intervallo di valori della concentrazione di albumina nel sangue varia da 3,5 a 5,0 g/dL e costituisce circa il 60% di tutte le proteine plasmatiche, dette complessivamente globuline. Essa è essenziale per la regolazione ed il mantenimento della pressione oncotica, ovvero la pressione osmotica necessaria per la corretta distribuzione dei liquidi corporei nel compartimento vascolare e nei tessuti. Tra gli studi più importanti condotti su questa proteina merita di essere citata la determinazione della sua struttura cristallina [Sugio (1999)], riportata in figura 4.

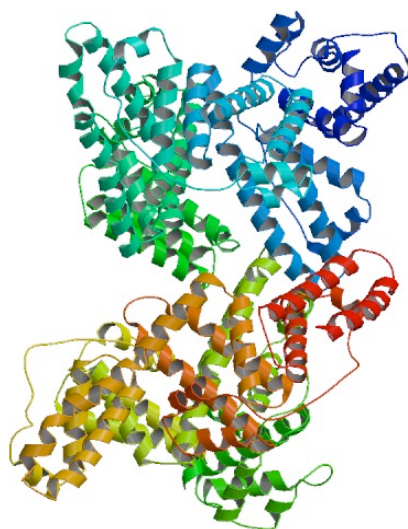


Figura 4. Struttura dell'albumina, il cui peso molecolare è di 69000 dalton.

Un altro risultato di grande interesse per le analisi che saranno mostrate in seguito è stata la comprensione delle interazioni che si sviluppano tra l'albumina e l'apomorfina. Tramite tecniche di ultrafiltrazione infatti si è giunti a constatare che le molecole di apomorfina si legano in maniera covalente a questa proteina [Smith (1985)]. In altre parole per comprendere la distribuzione del farmaco all'interno dell'organismo, il suo metabolismo e la sua eliminazione occorre considerarne l'interazione proprio con l'albumina. Per questo motivo, al fine di simulare inizialmente il plasma

* Per la stesura del paragrafo 6.3 si rimanda al seguente indirizzo web: www.rcsb.org/pdb

umano si è ricorsi all'utilizzo di questa proteina, in quanto in grado di approssimare in maniera adeguata il comportamento globale dell'intera parte proteica del sangue.

6.4 Detezione dell'apomorfina in soluzione di albumina o plasma con TLC

Al fine di procedere con analisi sperimentali più accurate e in condizioni realistiche si è quindi deciso di ottenere soluzioni acquose di albumina e apomorfina in grado di avvicinarsi il più possibile a quelle che sono presenti in un organismo umano. Nel caso dell'albumina si è proceduto a sciogliere in 0,36 mL di acqua deionizzata 20 mg della proteina, al fine di raggiungere successivamente una concentrazione equivalente a 5 g/dL (corrispondente a $7,2 \cdot 10^{-4}$ M).

Per quanto riguarda invece il farmaco si è preso come riferimento direttamente la documentazione allegata al medicinale, la quale indica in 1 mg di principio attivo la dose di iniezione standard. Poiché la concentrazione di apomorfina nella soluzione acquosa del preparato farmaceutico risulta 10 mg/mL, il volume da iniettare per ogni somministrazione equivale a 0,1 mL. Conoscendo allora il peso molecolare della molecola e i milligrammi assunti per ogni iniezione è possibile calcolare il numero di moli connesso alla dose attraverso la seguente proporzione:

$$312,79 \text{ g} : 1 \text{ mol} = 0,001 \text{ g} : x \quad \text{da cui si ricava} \quad x \approx 3,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

A questo punto, considerando il volume ematico totale di un soggetto adulto pari a circa 5 L, la molarità del farmaco all'interno del corpo dopo l'iniezione di una dose risulta:

$$\frac{3,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol}}{5 \text{ L}} = 6,4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

Questo valore di molarità naturalmente è il risultato di un'approssimazione, soprattutto per quanto concerne il volume ematico totale. Tuttavia almeno l'ordine di grandezza può essere assunto come riferimento realistico per le analisi successive.

Risulta molto importante sottolineare che l'ordine di grandezza per la concentrazione di 10^{-7} M risulta nettamente inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura in riferimento ai metodi di somministrazione di infusione continua del farmaco. Tali metodi infatti possono arrivare a produrre addirittura concentrazioni del farmaco attorno ai 10^{-4} M [*Manson (2001)*]*.

* Oltre alla letteratura già indicata per il paragrafo 6.4 si rimanda anche al seguente indirizzo web:
http://www.conference.co.nz/files/1530_A_Evans_2nd.pdf

Definita quindi questa molarità di riferimento si è diluita successivamente una soluzione di Apofin[®] fino ad una concentrazione di 10^{-6} M: da questa soluzione sono stati prelevati 0,04 mL e aggiunti nella soluzione acquosa di albumina in modo da raggiungere una concentrazione del farmaco pari a 10^{-7} M. Da notare che attraverso l'aggiunta di 0,04 mL di soluzione acquosa contenente Apofin[®] la concentrazione di albumina raggiunge i 20 mg in 0,4 mL, pari ai 5 g/dL indicati nel paragrafo precedente. Successivamente questa soluzione acquosa contenente albumina e apomorfina in concentrazioni realistiche** è stata deposta su una lastrina TLC attraverso un capillare. Terminato il tempo necessario alla completa evaporazione dell'acqua, la lastrina di silice è stata inserita in un contenitore di vetro e disposta in verticale, utilizzando come eluente l'etanolo. La risalita capillare dell'etanolo può essere interrotta quando il suo livello sulla lastrina risulta ben al di sopra dell'alone lasciato precedentemente ad opera della goccia di soluzione di albumina e Apofin[®]. In questo modo infatti è possibile operare una certa separazione tra i due componenti della soluzione, a patto che non sviluppino forti interazioni fra loro. Anche in questo caso, dopo l'estrazione della lastrina imbevuta di etanolo, occorre aspettare il tempo necessario alla completa evaporazione dell'eluente dallo strato di silice. A questo punto alcune gocce di colloide di argento concentrato 20 volte per centrifugazione sono state poste sulla lastra, in corrispondenza della zona posta più in alto rispetto a quella delimitata dall'alone rimasto in seguito alla deposizione della soluzione acquosa. Si è scelto di depositare le nanoparticelle in questo punto dal momento che, l'eventuale trascinarsi dell'apomorfina a scapito dell'albumina, molto più ingombrante dal punto di vista sterico, non potrebbe naturalmente avvenire altrove, dovendo seguire per forza la risalita dell'etanolo. In seguito alla deposizione delle nanoparticelle di argento si è notato in alcuni punti un immediato viraggio di colore della soluzione la quale, al termine della evaporazione dell'acqua, mostrava spiccati riflessi metallici di colore marrone con sfumature tendenti al grigio.

Si riporta in figura 5 lo spettro SERS (in rosso) di un punto della lastrina TLC interessato dall'aggregazione delle nanoparticelle, al di sotto del quale si presume possa esserci apomorfina libera. Il confronto con gli altri spettri SERS in figura 5 permette di analizzare e comprendere quello di interesse. Tali spettri a supporto sono:

- spettro SERS delle sole nanoparticelle di argento concentrate e deposte su lastrina TLC (blu)
- spettro SERS della soluzione acquosa di sola albumina $7,2 \cdot 10^{-4}$ M (5 mg/mL) (magenta)
- spettro SERS di una soluzione diluita di apomorfina in colloide di argento (verde)

** La concentrazione di apomorfina nel campione è quindi pari a 10^{-7} M mentre quella di albumina è pari a $7,2 \cdot 10^{-4}$ M (5 mg/mL). Pertanto per ogni molecola di apomorfina vi sono in soluzione circa 7200 molecole di albumina.

Tutti gli spettri mostrati sono stati registrati con eccitatrice a 514 nm. Lo spettro in blu del solo colloide depositato su TLC non mostra nella regione spettrale di interesse alcun segnale significativo. Questo fatto esclude di dover considerare segnali provenienti dal citrato nell'analisi degli spettri relativi alla soluzione della sola albumina e a quella contenente albumina e apomorfina. Lo spettro SERS della soluzione contenente albumina e apomorfina in rosso risulta infatti molto simile a quello in magenta relativo alla sola albumina. Non si osservano quindi nello spettro in rosso segnali evidenti attribuibili all'apomorfina. Poiché è noto in letteratura che l'apomorfina è in grado di interagire fortemente con l'albumina [Smith (1985)] se ne deduce che a questi livelli di bassa concentrazione di apomorfina rispetto all'albumina la quasi totalità del farmaco si trova legata alla proteina. In queste condizioni i meccanismi di interazione diretta fra apomorfina e argento, che porterebbero al segnale SERS del farmaco (come mostrato dallo spettro verde), sono evidentemente inibiti. Si pensa quindi che questa sia la causa più probabile dell'assenza di segnale attribuibile all'apomorfina nello spettro in rosso.

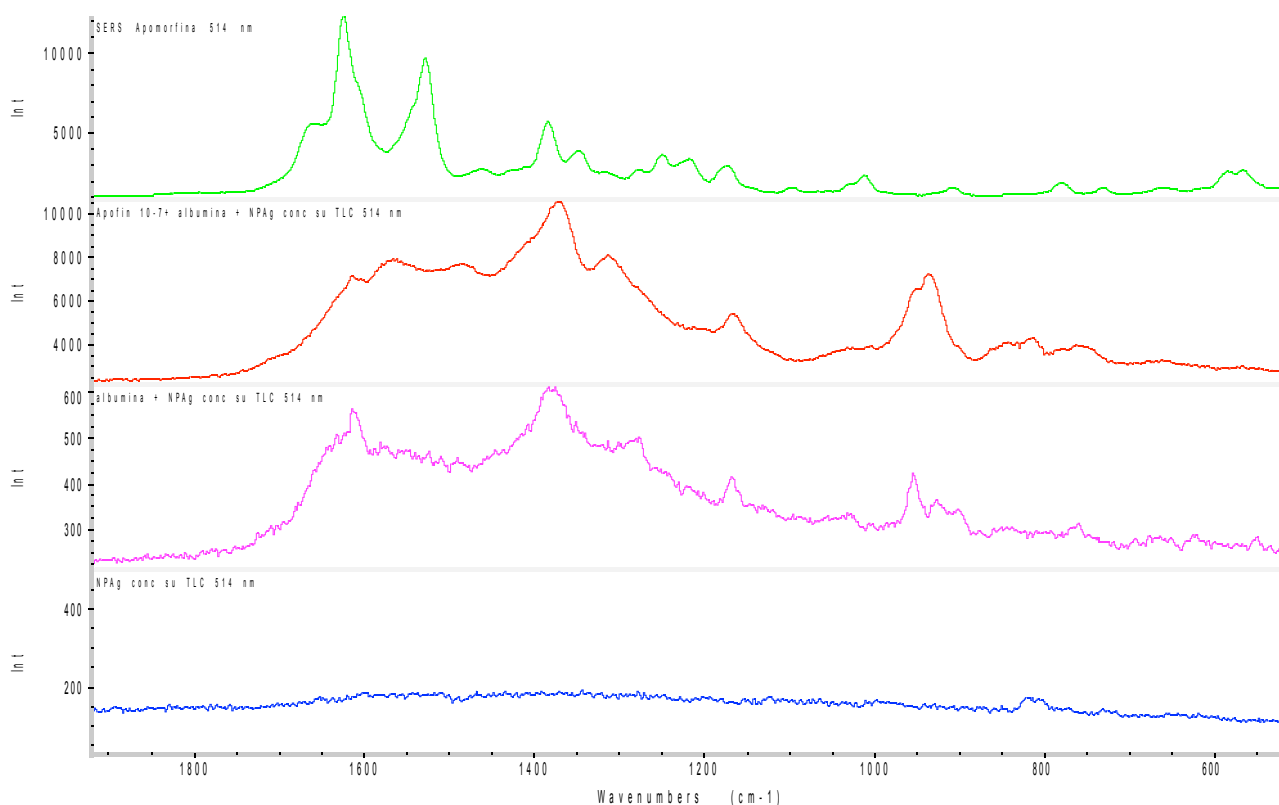


Figura 5. In rosso spettro SERS della soluzione acquosa di albumina e Apofin® (10^{-7} M) deposita su lastra TLC e lasciata evaporare: l'effetto SERS è stato ottenuto deponendo in seguito nanoparticelle di argento concentrate. Lo spettro in magenta è il SERS di una soluzione acquosa di sola albumina, ottenuto con la stessa procedura impiegata per la registrazione dello spettro in rosso. Lo spettro in blu invece è il SERS del colloide di argento dopo che è stato lasciato evaporare su una lastra TLC, infine lo spettro in verde è il SERS, ottenuto sempre con colloide di argento concentrato, dell'apomorfina diluita in soluzione acquosa.

Tuttavia, come risulta chiaro da un confronto tra gli spettri in verde, in rosso e in magenta della figura 5, vista la forte sovrapposizione fra segnali SERS dell'apomorfina e dell'albumina nella regione tra 1600 e 1300 cm^{-1} , non si può escludere una limitata presenza di segnali SERS attribuibili al farmaco relativamente allo spettro in rosso.

Vista l'oggettiva difficoltà nel registrare segnali SERS dell'apomorfina a concentrazioni così basse, si è deciso di effettuare misure nel plasma a concentrazioni maggiori, vale a dire 10^{-4} M. Questo livello di concentrazione, pur essendo maggiore di tre ordini di grandezza rispetto al precedente, ha tuttavia ancora una propria rilevanza dal punto di vista terapeutico. Nel caso dei pazienti sottoposti ad infusione continua del farmaco è possibile infatti raggiungere tali livelli di molarità nel plasma [Manson (2001)]. Operando quindi a queste concentrazioni si confida in una maggiore disponibilità di apomorfina libera capace di produrre segnale SERS. Infatti ci sono in queste condizioni circa 7 molecole di albumina per ogni molecola di apomorfina.

Dal punto di vista sperimentale si è proceduto ottenendo una soluzione di Apofin[®] 10^{-4} M in plasma: tale soluzione è stata deposta su una lastra per TLC e lasciata evaporare. In seguito la separazione tra l'apomorfina e il plasma è stata effettuata inserendo la lastra in un contenitore con etanolo, e aspettando il tempo necessario affinché l'eluente operasse la risalita. Terminata la risalita, si è atteso il tempo necessario all'evaporazione dell'etanolo. Al di sopra dell'alone lasciato dal plasma sulla lastra sono state deposte alcune gocce di colloide concentrato al fine di rilevare le molecole di apomorfina eventualmente separate dall'eluente.

I risultati ottenuti da questa analisi SERS sono sintetizzati nella figura 6, dove si riporta uno spettro (in blu) misurato nelle condizioni sperimentali appena descritte. Esso viene confrontato con un segnale SERS dell'apomorfina (in rosso) ottenuto con colloide di argento concentrato in soluzione acquosa. Entrambi gli spettri sono stati registrati con eccitatrice a 785 nm. Dalla figura 6 si nota la sovrapposibilità quasi perfetta tra i segnali dei due spettri, a dimostrazione che nel punto in cui è stata effettuata la misura l'apomorfina risulta separata dalla proteina. In altre parole a tale livello di concentrazione nel plasma (10^{-4} M) non tutta l'apomorfina si lega all'albumina. La frazione libera che rimane è in grado di essere effettivamente separata tramite TLC fornendo un segnale SERS praticamente identico a quello misurabile in soluzione acquosa colloidale.

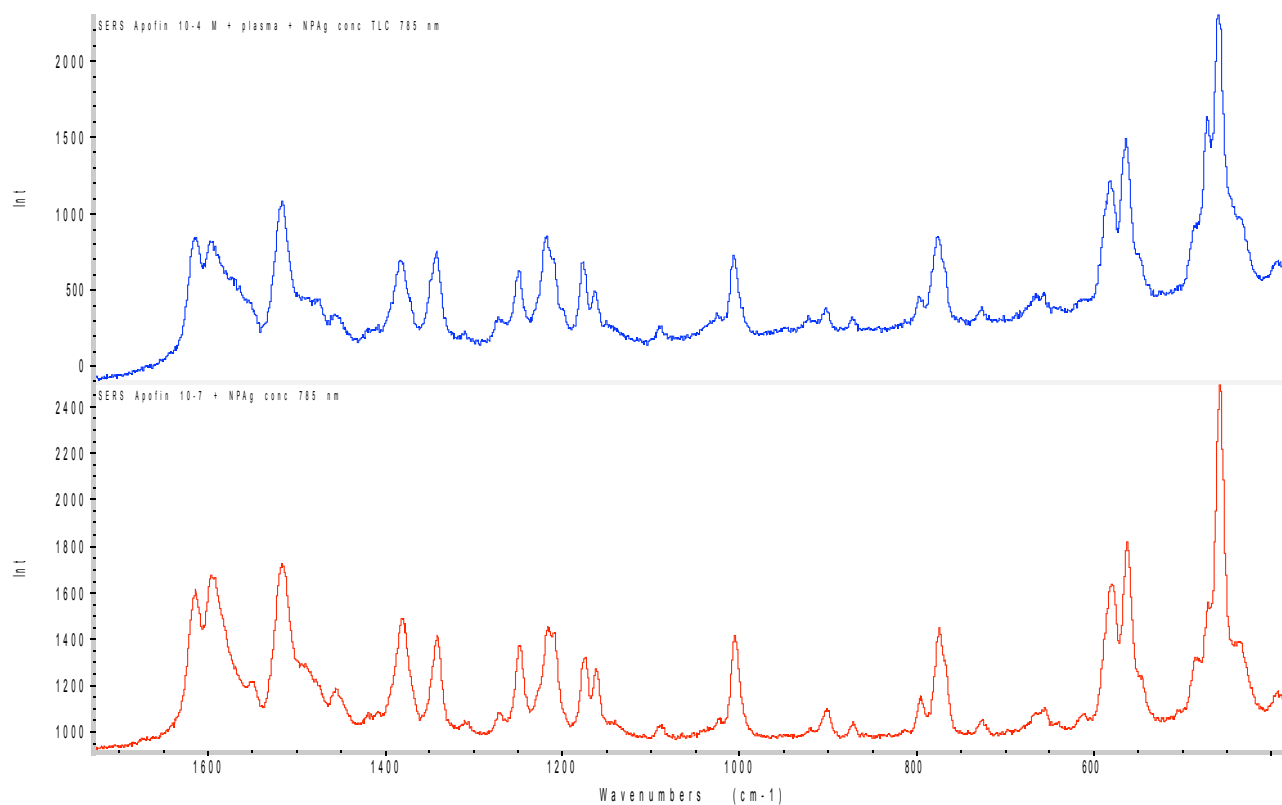


Figura 6. In blu spettro SERS dell'Apofin® (10^{-4} M) in plasma dopo aver depositato la soluzione su lastra TLC e aver operato separazione con etanolo. L'effetto SERS è stato ottenuto per mezzo di nanoparticelle di argento concentrate. In rosso spettro SERS dell'Apofin® (10^{-7} M) in soluzione acquosa ottenuto con colloide di argento concentrato.

Conclusioni

In questo lavoro di tesi si è mostrato come, dopo aver sintetizzato vari colloidi di argento secondo il metodo di Lee-Meisel (1982), risulti molto complicato ottenere distribuzioni e dimensioni medie di nanoparticelle simili per ogni sintesi. Ciò è stato dimostrato mediante spettroscopia di assorbimento UV-VIS, che evidenzia picchi di assorbimento e larghezze a metà altezza che differiscono in modo sensibile fra loro. La forte dipendenza rispetto ai molti parametri sperimentali in gioco rende questo metodo di sintesi intrinsecamente poco adatto a ottenere picchi di assorbimento plasmonico e distribuzioni di nanoparticelle costanti. Tuttavia per il colloide con picco di assorbimento a 420 nm la stima del coefficiente di estinzione molare (ϵ_{420}) si è mostrata in perfetto accordo con i dati di letteratura [Catenacci (2001)].

Per quanto riguarda i colloidi di oro, essi sono stati sintetizzati tramite il metodo di Turkevich (1951) e hanno mostrato una lunghezza d'onda del picco di assorbimento plasmonico consistente con le indicazioni fornite dalla letteratura [Xiaohui Ji (2007)]. Anche in questo caso è stata effettuata la misura del coefficiente di estinzione molare, la quale tuttavia risulta difficilmente confrontabile con i dati reperiti in letteratura in quanto troppo disomogenei [Jain (2006), Link (1999)].

La centrifugazione dei colloidi di argento ha permesso di comprendere che, nel caso di distribuzioni molto ampie, è possibile tramite centrifugazione differenziale applicare ad essi dei “filtri dimensionali”, in modo tale da selezionare diametri di nanoparticelle definiti all'interno della distribuzione di partenza. Il principio su cui questa procedura sperimentale si basa è la formazione di due zone distinte a partire dal colloide di partenza: una zona sopranatante limpida contenente particelle dai diametri piccoli, e una zona concentrata ed otticamente opaca costituita da nanoparticelle grosse e rods. In questo modo, applicando dei filtri incrociati e iterando la procedura, è possibile selezionare un range di diametri ben definito a partire dalla distribuzione iniziale selezionando il tempo di centrifugazione ed il numero di giri con cui si esegue la centrifugazione.

Sempre per mezzo della centrifugazione si è notato come, tramite una semplice concentrazione dei colloidi di argento, sia possibile effettuare rilevazioni di analiti in soluzione acquosa a molarità minori rispetto a quelle analizzabili con colloidi non concentrati, arrivando in questo caso fino a 10^{-9} M. Per ottenere rilevazioni a bassa molarità ci si è avvalsi anche della possibilità di far aggregare il

colloide con l'aggiunta di NaCl, al fine di entrare in risonanza e quindi ottenere effetto SERS con eccitatrici a più elevate lunghezza d'onda di quelle usualmente impiegate. Gli studi compiuti sulla riproducibilità dei segnali a parità di condizioni sperimentali hanno mostrato deviazioni standard percentuali attorno al 25%: tale valore dimostra che l'idea di effettuare analisi semi-quantitative su analiti in soluzione non è affatto impraticabile.

Interessante è il risultato fornito dallo studio sulla cinetica di aggregazione del colloide. Riportando su un grafico l'intensità di una banda dell'analita studiato in funzione del tempo, si è notato lo sviluppo di due stadi cinetici differenti. Il primo stadio, in cui le nanoparticelle dopo aggiunta del sale aggregano progressivamente entrando sempre di più in risonanza con la lunghezza d'onda dell'eccitatrice, porta ad un aumento dell'intensità rilevata fino al raggiungimento di un massimo. Il secondo stadio, che inizia in corrispondenza di questo massimo, è caratterizzato invece da una diminuzione del segnale, dovuto alla progressiva crescita nel tempo degli aggregati, i quali divenuti troppo pesanti si portano sul fondo uscendo dal volume di scattering. Questa analisi ha permesso di comprendere il comportamento cinetico generale di un processo di aggregazione e ha definito, con il raggiungimento del massimo segnale SERS, il tempo che occorre attendere per essere nelle migliori condizioni sperimentali.

Un altro aspetto indagato nel corso della tesi ha riguardato la rilevazione di analiti su substrati solidi, costituiti da nanoparticelle di oro e argento immobilizzate. In particolare le analisi si sono rivolte alla registrazione di mapping Raman sia monodimensionali che bidimensionali, i quali hanno confermato la natura locale dell'effetto SERS. Infatti, è stato possibile effettuare le rilevazioni a molarità più basse in corrispondenza di zone all'interno dei substrati che presentano aggregazione delle nanoparticelle ed elevata densità di hot-spot, condizioni necessarie per avere innalzamenti del segnale SERS. Inoltre questi mapping Raman forniscono in generale segnali crescenti all'aumentare del numero di layer presenti sul vetro, rendendo possibile la rilevazione di segnali provenienti non solo da aggregati ma anche da zone ricoperte in maniera uniforme da nanoparticelle metalliche.

Dai risultati ottenuti si può concludere la possibilità di eseguire su questi substrati ulteriori analisi di riproducibilità del segnale SERS ottenendo deviazioni standard percentuali accettabili a patto di eseguire le misure su aree sufficientemente estese, svincolandosi in questo modo il più possibile dalla presenza di aggregati localizzati in determinati punti. All'aumentare dell'area sottoposta ad analisi infatti, i valori ricavati sarebbero il frutto di medie sempre più estese e quindi più affidabili per rilevazioni semi-quantitative.

Infine per mezzo della tecnica TLC (Thin Layer Chromatography) è stato possibile separare l'apomorfina libera presente nel plasma e registrare i suoi segnali Raman attraverso l'impiego di colloidali di argento concentrati, in grado di fornire enhancement molto elevati. Tale analisi è stata effettuata in condizioni di concentrazione molare paragonabili a quelle di trattamenti terapeutici ad alto dosaggio (10^{-4} M) [Manson (2001)]. Questo risultato appare incoraggiante per possibili applicazioni del SERS in ambito clinico, dando modo di poter diagnosticare rapidamente e con minima preparazione del campione la presenza dell'apomorfina all'interno del plasma.

Bibliografia (in ordine alfabetico secondo il cognome del primo autore)

J. Abid, Laser Induced Synthesis and Non Linear Optical Properties of Metal Nanoparticles, Thesis Work, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, (2003)

R. Alvarez-Puebla, D. Dos Santos, R. Aroca, Surface-enhanced Raman scattering for ultrasensitive chemical analysis of 1 and 2-naphthalenethiols, Analyst, 129, 1251-1256, (2004)

A. Argiolas, H. Hedlund, The pharmacology and clinical pharmacokinetics of apomorphine SL, BJU International, 88 (suppl. 3) 18-21, (2001)

C. Castiglioni, "Concetti di dinamica molecolare", in Metodi spettroscopici di caratterizzazione dei polimeri, Farina ed., (1992).

M. Catenacci, Metodi fisici per la determinazione di analiti a bassissima concentrazione, Tesi di Laurea, Università degli studi della Tuscia Viterbo, (2001)

G. Chumanov, K. Sokolov, B. Gregory, T. Cotton, Colloidal Metal Films for Surface Enhanced Spectroscopy, J. Phys. Chem., 99, 9466-9471, (1995)

C. Coble, S. Skrabalak, D. Campbell, Y. Xia, Shape-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles for Plasmonic and Sensing Applications, Plasmonics, 4, 171-179, (2009)

J. Creighton, C. Blatchford, M. Albrecht, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 75, 790 (1979)

M. Cyrankiewicz, T. Wybranowski, S. Kruszewski, Study of SERS efficiency of metallic colloidal systems, XIII International Seminar on Physics and Chemistry of Solids IOP Publishing Journal of Physics: Conference Series 79, (2007)

M. Daniel, D. Astruc, **Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology**, Université de Bordeaux, France, (2003)

B. Deryagin, L. Landau, *Acta Phys. Chim. URSS*, 14, 633, (1941)

K. Domke, D. Zhang, B. Pettinger, **Toward Raman Fingerprints of Single Dye Molecules at Atomically Smooth Au(111)**, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 14721-14727, (2006)

Enciclopedia Scientifica Tecnica, ed. Garzanti, (1971)

Erriu, Nitti, Verniglio "Elementi di Fisica", capitolo 7, ed. Mondurri

P. Etchegoin, **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects**, Elsevier ed., (2009)

J. Garrido, C. Delerue-Matos, F. Borges, T. Macedo, A. Olivera-Barret, **New Insight into the Oxidation pathways of apomorphine**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2, 1713-1717, (2002)

C. Goss, D. Charych, M. Majda, **Application of (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane as a Molecular Adhesive in the Fabrication of Vapor-Deposited Electrodes on Glass Substrates**, *Anal. Chem.*, 63, 85-88, (1991)

K. Grabar, R. Griffith Freeman, M. Hommer, M. Natan, **Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers**, *Anal. Chem.*, 67, 735-743, (1995)

K. Grabar, K. Allison, B. Baker, R. Bright, K. Brown, G. Freeman, A. Fox, C. Keating, M. Musick, M. Natan, **Two Dimensional Arrays of Colloidal Gold Nanoparticles: A Flexible Approach to Microscopic Metal Surface**, *Langmuir*, 12, 2353-2361, (1996)

P. Jain, K. Lee, I. El-Sayed, M. El-Sayed, *J. Phys. Chem., B* 110, 7238, (2006)

P. Jal, S. Patel, B. Mishra, **Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions**, *Talanta* 62, 1005-1028, (2004)

K. Klabunde, *Nanoscale Materials in Chemistry*, John Wiley & Sons ed., cap. 5, (2001)

K. Kneipp, *M.I.T. Course Lessons*, 6.975, Spring 2001

Kuyper, *The Oxidation of citric acid*, *Journal American Chemical Society*, 55, 1722, (1933)

D. Ledwith, A. Whelan, J. Kelly, *A Rapid, Straight-Forward method for controlling the morphology of stable silver nanoparticles*, *Journal of Material Chemistry*, 17, 2459-2464, (2007)

P. Lee, D. Meisel, *Adsorption and Surface Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols*, *J. Phys. Chem.*, 86, 3391-3395, (1982)

L. Lu, H. Wang, Y. Zhou, S. Xi, H. Zhang, J. Hub, B. Zhaob *Seed-mediated growth of large, monodisperse core-shell gold-silver nanoparticles with Ag-like optical properties*, *Chem. Commun*, 144-145, (2002)

P. LeWitt, *Subcutaneously administered apomorphine*, *Pharmacokinetics and Metabolism, Neurology*, S9, 62, (2004)

S. Link, Z. Wang, M. El-Sayed, *Alloy Formation of Gold-Silver Nanoparticles and the Dependence of the Plasmon Absorption on their Composition*, *J. Phys. Chem.*, 103, 3529-3533, B (1999)

S. Link, M. El-Sayed, *J. Phys. Chem.*, B 103, 8410, (1999)

A. Lucotti, *SERS (Surface Enhanced Raman Scattering): applicazioni in fotonica e sensoristica*, tesi di Dottorato, Politecnico di Milano, cap. 3, (2005)

A. Lucotti, M. Casella, M. Tommasini, F. Gramatica, E. Di Fabrizio, G. Zerbi, *Experimental and theoretical investigation of the apomorphine Raman spectrum*, *J. Raman Spectrosc.*, 40, 2074-2079, (2009)

A. Lucotti, M. Tommasini, M. Casella, A. Morganti, F. Gramatica, G. Zerbi, *Detection of apomorphine by means of TLC-based SERS technique*, (to be published)

A. Manson, H. Hanagasi, K. Turner, P. Patsalos, P. Carey, N. Ratnaray, A. Lees, **Intravenous apomorphine therapy in Parkinson's disease**, *Brain*, 331-340, 124, (2001)

A. Mattheisen et al., *Proc. R. Soc. London B. Biol. Sci.*, 17, 455, (1869)

R. Menon, M. Stacy, *Expert Opin. Pharmacother.* 2007, 8, (1941)

D. Muguet, E. Broussolle, G. Chazot, *Biomed. Pharmacother.*, 49, 197, (1995)

S. Park, J. Im, J. Im, B. Chun, J. Kim, **Adsorption Kinetics of Au and Ag Nanoparticles on Functionalized Glass Surfaces**, *Microchemical Journal*, 63, 71-79, (1999)

A. Pesapane, **Surface Enhanced Raman Spectroscopy-Ottimizzazione e sviluppo di sensori in fibra ottica**, tesi di Laurea, Politecnico di Milano, cap.3, (2005)

A. Pesapane, A. Lucotti, G. Zerbi, **Fiber-optic SERS sensor with optimized geometry: testing and optimization**, *Journal of Raman Spectroscopy*, 41, 256-267, (2009)

M. Priston, G. Sewell, **Novel liquid chromatographic assay for the low-level determination of apomorphine in plasma**, *Journal of Chromatography, B* 681, 161-167, (1996)

L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. Garcia-Ramos, G. Morcillo, **Growth of Silver Colloidal Particles Obtained by Citrate Reduction to Increase the Raman Enhancement Factor**, *Langmuir*, 17, 574-577, (2001)

C. Seney, B. Gutzman, R. Goddard, **Correlation of Size and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Optical and Spectroscopic Properties for Silver Nanoparticles**, *J. Phys. Chem.*, 113, 74-80 C, (2009)

D. J. Shaw, **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**, Butterworth-Heinemann ed., cap. 7-8, (1992)

R. Smith, R. Velagapudi, A. McLean, R. Wilcox, **Interactions of Apomorphine with Serum and Tissue Proteins**, *J. Med. Chem.*, 28, 613-620, (1985)

S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, **Crystal Structure of human serum albumine at 2.5 Å resolution**, *Protein Engineering*, vol. 12, n° 6, 439-446, (1999)

J. Turkevich, P. Stevenson, J. Hillier; **A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of colloidal Gold**, (1951)

E. Verwey, J. Overbeek, **Theory of the Stability of Lyophobic Colloids**, Elsevier, ed., (1948)

R. Wilson, G. Lynn, B. Milosavljevic, D. Meisel, **Synthesis and Characterization of 'Naked' Silver Particles**.

Xiaohui Ji, Xiangning Song, Jun Li, Yubai Bai, Wensheng Yang, Xiaogang Peng, **Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate**, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 13939-13948 9, (2007)

Xiong Liu, M. Atwater, Jinhai Wang, Qun Huo, **Extinction Coefficient of Gold Nanoparticles with Different Sizes and Different Capping Ligands**, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58, 3-7, (2007)

G. Zerbi, "Spettroscopia Raman", in **Metodi spettroscopici di caratterizzazione dei polimeri**, Farina ed., (1992).

G. Zerbi, "Strumentazione per spettroscopia vibrazionale", in **Metodi spettroscopici di caratterizzazione dei polimeri**, Farina ed., (1992).