
Caracterización vibracional de colorantes históricos sintéticos de interés para el patrimonio cultural mediante técnicas espectroscópicas ópticas basadas en efectos plasmónicos no destructivos

Trabajo Fin de Máster: Alba Espina García

Directora: Doctora Adianez García Leis

Codirectora: Catedrática Marta Elena Díaz García

Asturias 2016



DEPARTAMENTO DE ESPECTROSCOPIA NUCLEAR, VIBRACIONAL Y DE MEDIOS
DESORDENADOS

INSTITUTO DE ESTRUCTURA DE LA MATERIA

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



MÁSTER EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE MATERIALES

ESCUELA DE INGENIERÍA DE MINAS, ENERGÍA Y MATERIALES DE OVIEDO

TRABAJO FIN DE MÁSTER

CARACTERIZACIÓN VIBRACIONAL DE PIGMENTOS HISTÓRICOS
SINTÉTICOS DE INTERÉS PARA EL PATRIMONIO CULTURAL
MEDIANTE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS ÓPTICAS BASADAS EN
EFECTOS PLASMÓNICOS NO DESTRUCTIVOS.

ALBA ESPINA GARCÍA

DIRECTORA: DOCTORA ADIANEZ GARCÍA LEIS

TUTORA: CATEDRÁTICA MARTA ELENA DÍAZ GARCÍA

JULIO 2016

ÍNDICE

1. Introducción.....	5
2. Teoría del color, colorante, lana y problemas de conservación.....	7
2.1 Teoría del color	7
2.2 Breve historia de los colorantes sintéticos	7
2.3 Clasificación de los colorantes	7
2.4 Colorantes de triarilmetano	8
2.5 Estructura de la lana	9
2.6 Problemas de conservación	10
3. Introducción a la espectroscopia vibracional.....	11
3.1 Interacción de la luz con la materia	11
3.2. Espectroscopía Raman	12
3.3 Espectroscopia SERS.....	12
3.3.1 Mecanismos de intensificación del efecto SERS.....	13
3.3.1.1 Mecanismo electromagnético	13
3.3.1.2 Mecanismo de transferencia de carga o químico.....	14
3.5 Reglas de selección del efecto SERS.....	15
4. Nanoestructuras metálicas	16
4.1 Plasmónica	16
4.2 Propiedades superficiales de las nanopartículas metálicas.....	16
5. Soportes SERS.....	18
5.1 Coloides metálicos.....	18
5.1.1 Coloides de Plata por reducción química:	18
5.2 Fotorreducción	19
6. Antecedentes de análisis sobre los tintes y fibras teñidas.....	20
HPLC.....	20
Espectroscopia vibracional.....	20
6. Objetivos.....	22
7. Material y métodos.....	23
7.1 Reactivos	23
7.2 Equipo instrumental	24
7.3 Métodos	25
7.3.1 Preparación de nanopartículas metálicas	25
Fotorreducción.....	25
Coloide de plata.....	25

7.3.2 Preparación de muestras sólidas, diluidas y en fibra	25
7.3.3 SERS en fibra por fotorreducción.....	28
8. Resultados y Discusión	30
8.1 Espectrofotometría UV-VIS	30
8.2 Espectroscopía Raman	30
8.3 SERS	32
8.3.1 SERS por fotorreducción.....	33
9. Conclusiones	39
10.Clausura.....	40
11. Bibliografía.....	41

1. INTRODUCCIÓN

Entre los términos colorante y pigmento existen grandes diferencias y sus definiciones así lo reflejan. Según la Asociación de Fabricantes de Pigmentos de Color, CPMA, (por sus siglas en inglés) los pigmentos son partículas sólidas fluorescentes que pueden ser orgánicas o inorgánicas generalmente insolubles en agua y que son química y/o físicamente modificadas por el vehículo o sustrato en el que se incorporan. Alteran su apariencia por la absorción selectiva y/o dispersión de la luz. Los pigmentos se dispersan generalmente en sustratos para su aplicación en la fabricación de tintas, pinturas, plásticos u otros materiales poliméricos. En el proceso de coloración los pigmentos retienen su estructura cristalina o particulada.

Por otra parte, la Asociación Ecológica y Toxicológica de Fabricantes de Colorantes y Pigmentos Orgánicos, ETAD, (por sus siglas en inglés), define a los colorantes como sustancias orgánicas, de coloración intensa o fluorescente, que le aportan color a un sustrato por la absorción selectiva de la luz. Son solubles en agua y/o pasan a través de un proceso de aplicación donde, al menos temporalmente, destruyen cualquier estructura cristalina mediante absorción, solución, retención mecánica o por enlaces químicos, iónicos o covalentes.

La identificación de los colorantes es esencial en las obras de arte para un completo estudio de la obra que ayudará a autenticar y datar, lo que proporciona una valiosa información para las posibles intervenciones de restauración y conservación.

Normalmente en la literatura se encuentran muchas más referencias sobre la caracterización de tintes naturales que de tintes sintéticos, los pigmentos naturales probablemente han sido considerados hasta ahora de mayor interés, pues han sido aplicados durante un periodo de tiempo mucho más extenso. Los colorantes sintéticos por el contrario han sido usados a partir de la edad moderna, pero poco después de su descubrimiento en la segunda mitad del siglo XIX remplazaron rápidamente a los tintes naturales por su bajo costo y mejor resistencia química, tanto en el ámbito de la industria textil como en materiales artísticos.

El análisis de estos colorantes sigue siendo todavía extremadamente difícil, ya que son muy fluorescentes, susceptibles de ser degradados en determinadas condiciones y por lo general se encuentran presentes en concentraciones traza o muy dispersos en objetos muy complejos. De hecho, un objetivo imprescindible en el estudio del patrimonio cultural sería el hallazgo de técnicas no destructivas de análisis adecuadas y sensibles que permitan su estudio in situ sin necesidad de la toma de muestras. [42]

La espectroscopía vibracional Raman proporciona una información muy valiosa en la identificación de materiales presentes en las obras de arte y el patrimonio cultural, ya que nos permite deducir la estructura química de las moléculas, pues se considera “la huella digital” de las mismas. Esta técnica proporciona información importante sobre la estructura molecular una vez que la fluorescencia se apaga. Además, permite el estudio de muestras microscópicas con gran resolución espacial cuando se utiliza un microscopio como accesorio de muestreo. [43] [44]

La espectroscopía Raman es también una técnica no invasiva cuyo empleo es deseable en los casos en que no se permite la toma de muestras. Sin embargo, la aplicación de la

técnica Raman al estudio de pigmentos orgánicos se ha limitado por la fuerte fluorescencia de fondo que presentan los colorantes orgánicos al ser expuestos a la excitación láser y la baja sensibilidad de la técnica Raman. Un fenómeno que puede mejorar significativamente la intensidad Raman es la dispersión Raman a través de superficies metálicas, SERS (por sus siglas en inglés, Surface Enhanced Raman Spectroscopy). Al utilizar la técnica SERS, las limitaciones inherentes de la espectroscopia Raman se superan gracias a la utilización de superficies metálicas nanoestructuradas para mejorar la señal y para disminuir la fluorescencia, al mismo tiempo. La intensidad de la normalmente débil dispersión Raman se aumenta por factores tan grande como 10^8 para los compuestos adsorbidos sobre un sustrato SERS, lo que permite la detección a nivel de trazas.

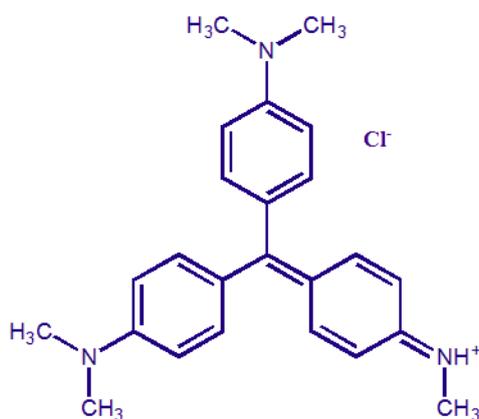


Figura 1.1: Molécula BV1

En este trabajo se realiza un estudio utilizando las técnicas espectroscópicas Raman y SERS del colorante violeta de metilo, también conocido como *Basic Violet 1* (ver estructura química en la **Figura 1.1:**).

2. TEORÍA DEL COLOR, COLORANTE, LANA Y PROBLEMAS DE CONSERVACIÓN

2.1 TEORÍA DEL COLOR

Cuando una molécula absorbe la luz visible o ultravioleta, un electrón es promovido a una energía de un orbital superior. La longitud de onda de la luz absorbida depende de la diferencia de energía entre el estado excitado y el estado fundamental de la molécula. Cuanto menor sea la diferencia entre los dos estados, mayor es la longitud de onda de la luz absorbida, hasta que es lo suficientemente larga para estar en el rango visible, y por lo tanto observamos color. [26] [27]

2.2 BREVE HISTORIA DE LOS COLORANTES SINTÉTICOS

En 1856 William Perkin descubrió la síntesis de Mauveine, el primer tinte sintético, el primero de otros muchos colorantes sintetizados en el laboratorio. A partir de este momento la investigación en la industria del tinte se intensificó y la evolución de la química orgánica ayudó en gran medida en el desarrollo comercial de la química del color.

Los nuevos colorantes textiles sintéticos eran más baratos, más eficaces, de fácil aplicación y proveedores de un mejor color y rendimiento técnico en comparación con los tintes naturales tradicionales.

Sólo cincuenta años después del descubrimiento de Perkin, alrededor del 90% de los colorantes textiles utilizados fueron ya sintetizados. Con pocas excepciones, la mayoría de los colorantes utilizados en la actualidad son de la primera mitad del siglo XIX. [26] [27] [28]

2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES

La principal publicación de referencia para la clasificación del color es el *Colour Index* (C.I.), publicado por primera vez en 1924 por la Sociedad de Tintoreros y Coloristas de Bradford, Inglaterra (ver figura 2.1). En él se enumeran y regularizan colorantes y pigmentos comerciales, dando a cada colorante un número código de identificación.

Estas moléculas están diseñadas específicamente para una aplicación particular y por lo tanto tienen una fuerte atracción con las moléculas de la fibra a teñir.

Los grupos químicos en los que se pueden clasificar los colorantes son: colorantes Azo, colorantes de Triarilmetano, colorante Xanteno, colorantes Thiazine, colorantes Nitro y colorantes Indigo.

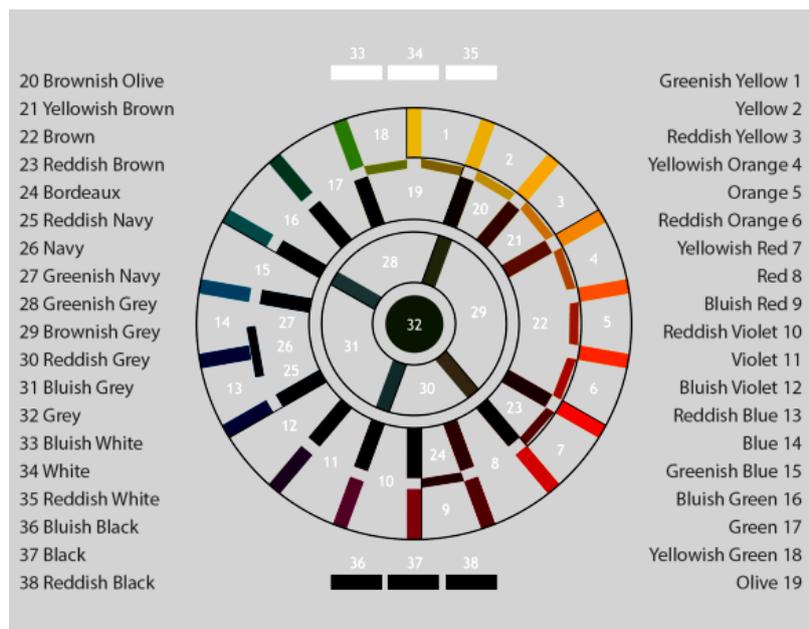


Figura 2.1: Esquema de la graduación del color propuesto por The Colour Index International for the Society of Dyes and Colorists y American Association of Textile Chemists and Colorists. [34]

El colorante que se ha escogido como objeto de estudio en el siguiente trabajo es el Violeta de Metilo o **Basic Violet 1** cuyo código de identificación es CI 42535, y se trata de un colorante de Triarilmetano (ver Figura 1.1 y 2.2).

2.4 COLORANTES DE TRIARILMETANO

Los colorantes más conocidos de este grupo son los Diarilmetano y Triarilmetano que poseen como característica estructural esencial un átomo de carbono central relativo a dos o tres anillos aromáticos (ver Figura 2.2).

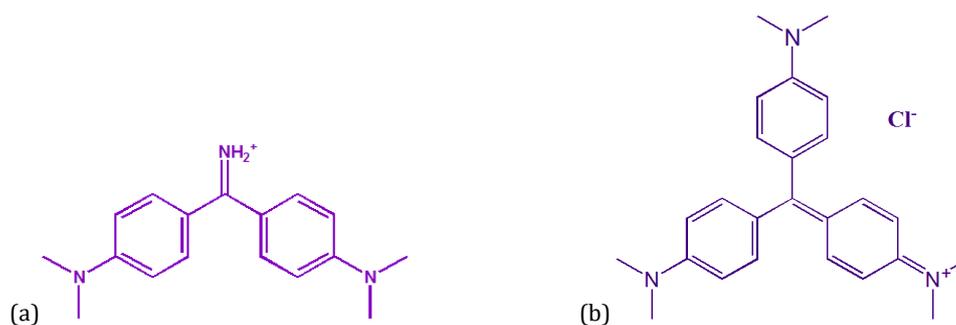


Figura 2.2: Moléculas de diarilmetano (a) y triarilmetano (b)

Generalmente son colorantes catiónicos, pero existen algunas excepciones de derivados neutros y aniónicos.

Los Triarilmetanos son los más utilizados y estables como colorantes. El catión trifenilmetilo puede ser considerado como el grupo cromóforo de base que otorga al pigmento un color violáceo-azulado. [26] [28]

- **Tiñen:** Se han utilizado para teñir seda, lana y algodón. Para la producción de tintas y coloración de papel, también empleado como colorante alimenticio, de

medicamentos, de cosméticos, para la tinción biológica y como agentes antimicrobianos.

- Secuencia de reacción del proceso de síntesis: Estas moléculas se construyen a partir de reacciones de sustitución aromática.

2.5 ESTRUCTURA DE LA LANA

La lana es una fibra natural animal derivada de vellón de oveja. Es una fibra a base de proteínas con una compleja composición química y estructural, compuesta principalmente por proteínas pertenecientes al grupo de alfa-queratinas, ver figura 2.3.

Este polímero biológico está formado por largas cadenas de polipéptidos que contienen dieciocho de los aminoácidos más comunes, como la cistina, lisina, arginina y glutamina.

Las cadenas están unidas entre sí por puentes disulfuro (-S-S-) obtenido a partir de cistina, pero también hay enlaces iónicos entre grupos amino protonados (-NH₃⁺) y grupos carboxilatos (-COO⁻), situados en los grupos laterales de los aminoácidos y al final de las cadenas de péptidos.

Muchos de estos grupos funcionales participan en las fuerzas de atracción de los colorantes sobre la fibra.

Nuestra lana de merino muestra muy buena resistencia a la tracción y elasticidad, es capaz de resistir ácidos diluidos y retener hasta un 30% de agua respecto de su peso en seco, una propiedad importante a la hora del teñido. Por otra parte, la superficie por lo general conserva su hidrofobicidad, dada por la capa lipídica que está unida covalentemente a ella.

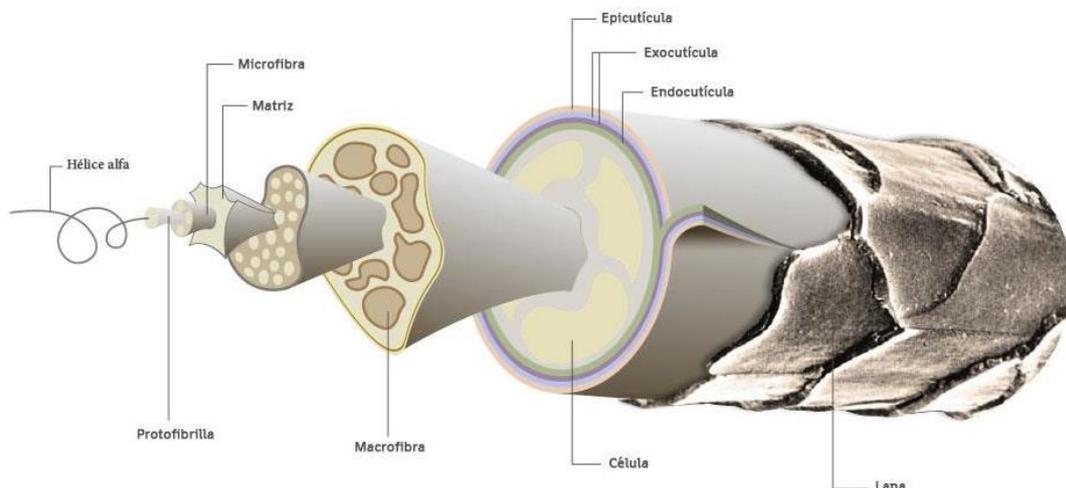


Figura 2.3: Lana de Merino

Hay que tener en cuenta que la queratina de la lana está contaminada por muchas impurezas como pueden ser la suciedad, cera de lana, lanolina, grasa, materia vegetal, entre otras y estas pueden alcanzar valores entre el 30 y 70% de su contenido. Esta suciedad es eliminada antes de la tintura, con grandes cantidades de detergente, un proceso de carbonización y un tratamiento con ácido sulfúrico, que principalmente elimina la materia vegetal. [26] [29] [30] [31]

2.6 PROBLEMAS DE CONSERVACIÓN

Hasta la segunda mitad del siglo XIX sólo se utilizaban colorantes naturales para dar color a materiales textiles, con frecuencia se utilizaban fijadores mordientes, la mayoría sales metálicas que forman complejos insolubles con los tintes. Ahí radica el principal problema de la degradación de tejidos teñidos con técnicas tradicionales pues estas sales se oxidan dañando la fibra causando innumerables degradaciones como pérdida de propiedades mecánicas del tejido, cambio de coloración y deterioro, llegando incluso hasta el punto de acabar con el tejido proporcionando pérdidas volumétricas irreparables.

3. INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

3.1 INTERACCIÓN DE LA LUZ CON LA MATERIA

La interacción de la luz con la materia puede causar transiciones entre los niveles de energía de las moléculas que la componen. Una transición desde un nivel bajo a uno más alto, acompañada por una transferencia de energía a la molécula, se llama **absorción**. Cuando la transición va de un nivel alto a uno más bajo, se llama **emisión** si la energía se transfiere en forma de luz, es decir radiación, o transición no radiativa si no emite radiación.

Por el contrario cada vez que hay un cambio en la radiación de la luz debido a su interacción con la materia tenemos el fenómeno de dispersión o **scattering**, que puede dar lugar con o sin transferencia de energía, si la luz esparcida tiene la misma longitud de onda se le denomina *scattering* elástico o Rayleigh, por el contrario si cambia ligeramente de longitud de onda se le conoce como *scattering* inelástico o Raman.

Cuando un haz monocromático de un láser con una determinada frecuencia interactúa con una molécula, el componente eléctrico del campo electromagnético de la luz ejerce una fuerza sobre todos los electrones de dicha molécula y tiende a desplazarse de sus posiciones de equilibrio alrededor de los núcleos cargados positivamente. Este proceso induce un momento dipolar en la molécula, es decir la convierte en un dipolo que vibra a la frecuencia del láser. Como consecuencia de ello la molécula emite una radiación, llamada radiación de dispersión o *Scattering* (ver Figura 3.1).

Este proceso físico de *Scattering* proporciona una gran cantidad de información sobre la estructura molecular y la interacción de las moléculas entre sí, pues se puede obtener los datos que describen las vibraciones moleculares, que no dejan de ser más que pequeñas oscilaciones de los átomos de una molécula alrededor de sus posiciones de equilibrio.

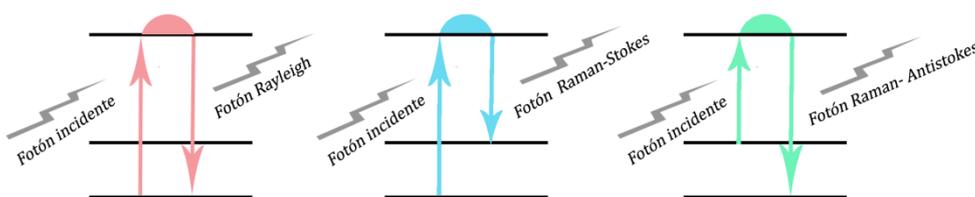


Figura 3.1: Tipos de dispersiones: 1- Dispersión elástica, 2 y 3-Dispersión inelástica

La amplitud de onda emitida es proporcional a la polarizabilidad de la molécula y esta depende de su tamaño, forma, orientación y puede modificarse cuando cambia alguno de estos parámetros.

Por lo tanto se conoce como espectro de absorción de una molécula concreta a la representación gráfica de la absorción de la luz por parte de dicha molécula en función de la longitud de onda. El espectro de la molécula depende de su estructura, la cual da lugar a unos determinados niveles de energía, que resultan muy útiles para la identificación de compuestos químicos.

En el caso de moléculas poliatómicas, el movimiento exacto de los átomos en un modo de vibración determinado depende, de sus masas y de lo fuertes que sean los enlaces en la molécula, es decir de la constante de la fuerza de cada enlace.

La aparición de una banda en una frecuencia característica de un grupo determinado nos sirve para intuir presencia de ese grupo en el compuesto. [37]

3.2. ESPECTROSCOPIA RAMAN

Se basa en un fenómeno de dispersión inelástica de los fotones de una luz monocromática incidentes sobre la muestra. La mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente, y es conocida como dispersión Rayleigh que no aporta información sobre la composición. Solo una fracción muy pequeña de luz dispersada, 1 fotón dispersado de cada 10^{11} incidentes, presenta ligeros cambios de frecuencia y es lo que conocemos como dispersión Raman, característica de la naturaleza química y el estado físico de la muestra pues su frecuencia resulta independiente de la luz incidente.

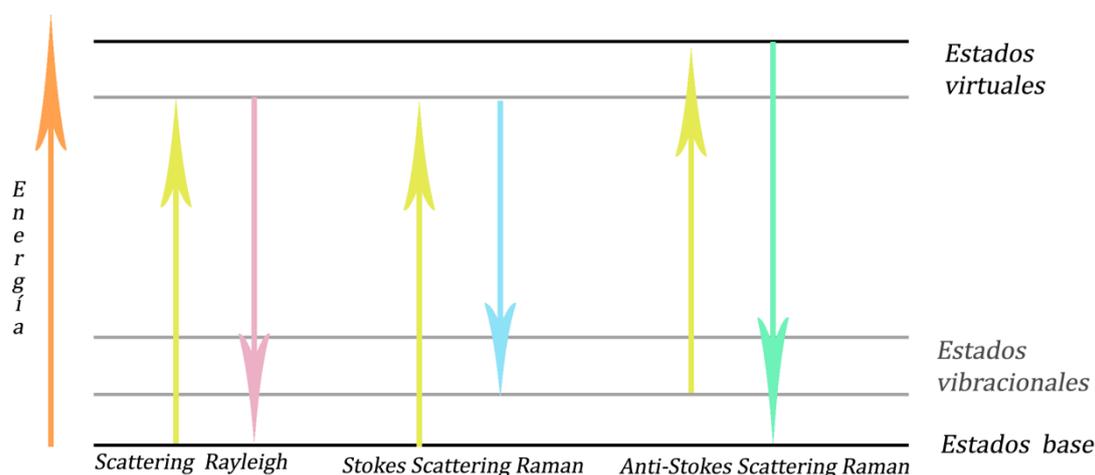


Figura 3.2: Representación esquemática de la dispersión Rayleigh, Raman Stokes y Raman Anti-Stokes.

En el caso de las moléculas de colorantes, la sección eficaz de fluorescencia es 10^{-6}cm^2 por molécula, mientras que la sección eficaz de la técnica Raman es de 10^{-30}cm^2 por molécula. Esto indica que hay una enorme diferencia ya que la fluorescencia es 10^4 veces más efectiva que la espectroscopía Raman, lo cual supone una gran desventaja a la hora de usar la espectroscopía Raman para detectar moléculas individuales.

La técnica SERS proporciona una información estructural mucho más rica, pues nos da un nuevo punto de vista a la hora de observar su comportamiento, tanto estático como dinámico sin el efecto promediado de las otras moléculas que lo rodean. [37]

3.3 ESPECTROSCOPIA SERS

La espectroscopía SERS se basa en el aumento de la dispersión inelástica, hasta 10^6 veces, procedente de determinadas moléculas adsorbidas o muy próximas a superficies metálicas nanoestructuradas.

Los sustratos metálicos nanoestructurados tienen la capacidad de soportar **plasmones superficiales**, es decir oscilaciones colectivas de sus electrones de conducción, que presentan resonancia en la zona visible del espectro electromagnético. Estos plasmones se manifiestan como excitaciones electromagnéticas que originan una enorme intensificación de los campos electromagnéticos tanto el incidente como el dispersado y decaen exponencialmente al alejarse de la superficie.

La intensificación detectada depende del metal empleado y de su morfología superficial, aunque también de la molécula a estudiar y demás variables experimentales.

No todas las bandas del espectro son intensificadas uniformemente, esta intensificación relativa es muy variable incluso para una misma molécula dependiendo de las condiciones de registro. Pero a diferencia del Raman esta técnica es capaz de bajar la intensidad de la fluorescencia. [37]

3.3.1 MECANISMOS DE INTENSIFICACIÓN DEL EFECTO SERS

Estos mecanismos aparecen debido a que las intensidades de las bandas de un espectro Raman dependen de la molécula de la que se trate, del momento dipolar inducido y del tipo de láser que se utiliza para obtener el espectro, luz que viene caracterizada por su frecuencia y por la intensidad del campo electromagnético que genera.

El momento dipolar inducido μ_{ind} en una molécula iluminada con una radiación caracterizada por un campo electromagnético es proporcional a la intensidad de dicho campo E.

$$\mu_{ind} = \alpha E$$

Siendo α la constante de proporcionalidad, lo que se conoce como polarizabilidad.

Al tener la misma frecuencia que los plasmones superficiales de la superficie metálica cerca de la cual se encuentra la molécula, la luz puede excitar dichos plasmones y multiplicar su campo **E** un factor, de por ejemplo 10^4 , tendremos un espectro Raman que será 10 000 veces más intenso.

Por otro lado al estar cerca del metal la propia molécula puede pasarle parte de su carga al metal, o viceversa lo que daría un espectro Raman del complejo metal-molécula, que puede llegar a ser hasta 10^2 veces más intenso. [37]

3.3.1.1 MECANISMO ELECTROMAGNÉTICO

El modelo del mecanismo electromagnético (EM) puede simplificarse considerando la intensificación de la señal Raman cuando incide una radiación de determinada frecuencia sobre la superficie de una nanoestructura metálica. La **Figura 3.3** muestra los procesos de dispersión Raman en ausencia y presencia de nanopartículas metálicas.

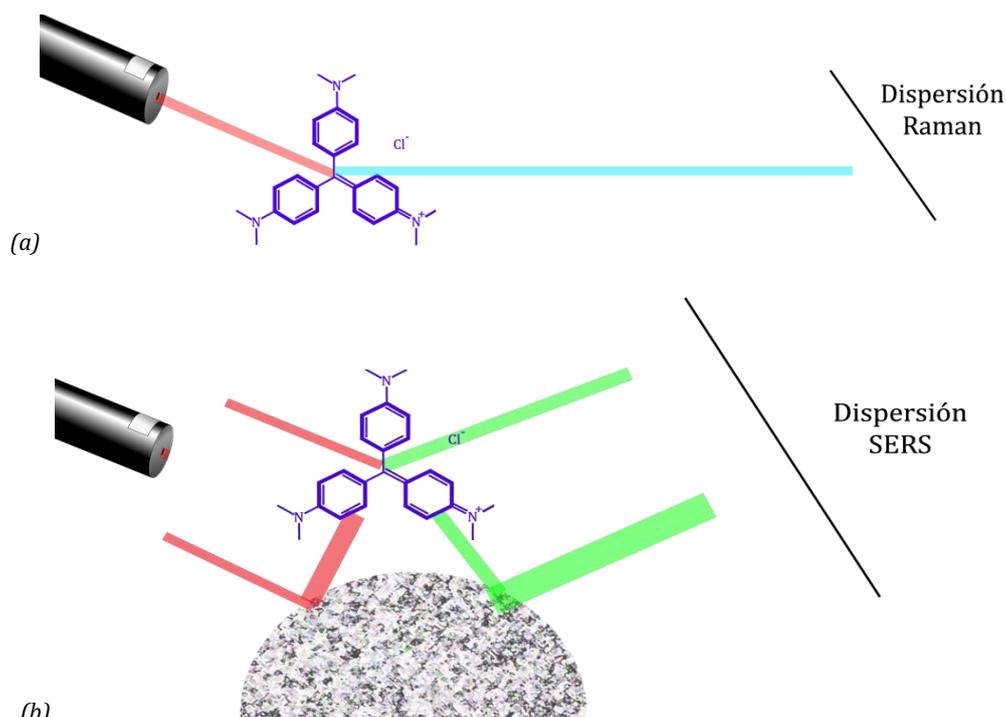


Figura 3.3: Proceso de dispersión Raman en: (a) ausencia y (b) presencia de nanopartículas metálicas esféricas

La intensidad del campo EM que incide sobre la molécula está compuesta por la intensidad de campo de la radiación láser a una determinada frecuencia y la misma frecuencia dispersada por el propio metal. La frecuencia se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal y el campo dispersado resulta mucho mayor. Este campo incidente induce en la molécula un momento dipolar que modulado por las vibraciones moleculares emite radiación Raman. El mecanismo EM predice una intensificación para moléculas situadas a distancias significativas de la superficie, es decir se trata de un modelo de largo alcance es decir de 1 a 10 nm de distancia entre la molécula y la superficie nanoestructurada. [35]

3.3.1.2 MECANISMO DE TRANSFERENCIA DE CARGA O QUÍMICO

El mecanismo de transferencia de carga (TC) se produce sólo en aquellas moléculas que forman un complejo con el metal. Se trata de un mecanismo de corto alcance. La molécula es excitada hasta el nuevo estado estacionario y la intensidad del espectro registrado en estas condiciones se intensifica. Normalmente la transferencia de carga es del metal a la molécula, cuanto más fuerte esté unida la molécula al metal mayor será la mezcla entre los orbitales y favorecerá la TC, ver **Figura 3.4**

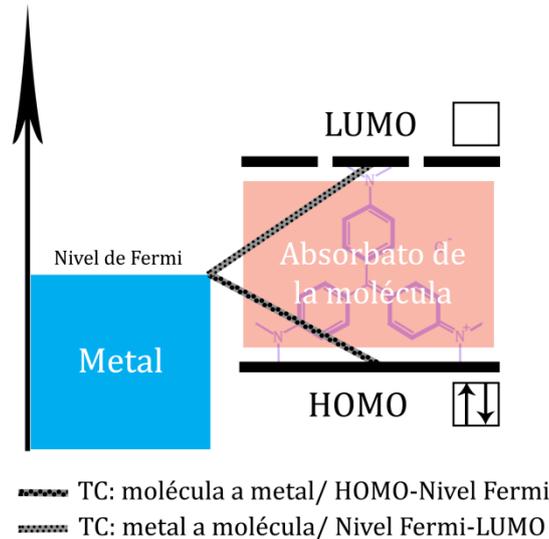


Figura 3.4: Esquema del mecanismo de transferencia de carga que ocurre entre el metal y la molécula en el efecto SERS.

Se pueden clasificar en:

- **Fisisorción:** la interacción entre el adsorbato y el metal es débil, por lo que la modificación de la polarizabilidad del adsorbato es pequeña resultando un espectro SERS bastante parecido al Raman, pero en ciertas ocasiones puede inducir una orientación fija de la molécula que da lugar a diferente intensificación de los modos vibracionales dependiendo de su simetría.
- **Quimisorción:** la alteración de la nube electrónica del adsorbato es significativa produciéndose la formación de un complejo superficial entre una molécula y el metal, en el que se originan nuevas transiciones electrónicas diferentes de las del propio metal o de la propia molécula. Este fenómeno actúa principalmente sobre la primera monocapa de adsorción. [35]

3.5 REGLAS DE SELECCIÓN DEL EFECTO SERS

ORIENTACIÓN DE LA MOLÉCULA.

El campo electromagnético exterior de la superficie metálica está fuertemente polarizado en dirección perpendicular a la misma, pues los modos vibracionales perpendiculares a la superficie presentan una intensificación mayor que los paralelos. [35]

4. NANOESTRUCTURAS METÁLICAS

A nivel de los nanomateriales, las leyes de la física atómica pueden cambiar algunas de las propiedades del material, pues su extremadamente pequeño tamaño está en la misma escala que el tamaño crítico de algunos fenómenos físicos, ya que en los nanomateriales su pequeño tamaño hace que muchos átomos, quizás más de la mitad en algunos casos, estén cerca de la superficie. Por ello algunas de las propiedades superficiales como los niveles de energía, la estructura electrónica y la reactividad pueden ser muy diferentes de las del interior, dando lugar a un material con nuevas propiedades.

Las nanopartículas metálicas y coloides se caracterizan por tener una alta relación superficie/volumen, lo que les confiere unas propiedades únicas y muy distintas a las clásicas del mismo material. El metal que produce el SERS más intenso es con diferencia la plata y en menor medida el cobre, el oro y los metales alcalinos aun que se han podido realizar SERS con todo tipo de metales. [35]

4.1 PLASMÓNICA

Es una rama de la nanofotónica que se basa en el estudio de los procesos de interacción entre la radiación electromagnética, la luz, y los electrones de conducción en la superficie del metal.

Los metales además de reflejar la luz, tienen una propiedad óptica menos conocida, pues bajo ciertas condiciones, la luz puede viajar por las superficies metálicas sin alejarse de ellas. Esta es una propiedad muy peculiar, ya que en condiciones normales la luz viaja por las tres dimensiones del espacio y no puede confinarse con facilidad. En realidad esta luz superficial es una onda más complicada que la luz normal, ya que no consiste solo en un campo electromagnético, sino que involucra también los electrones libres presentes en los metales.

Los comportamientos que se observan pueden interpretarse en base a la existencia de plasmones, que son oscilaciones colectivas de los electrones presentes en un metal. Estos presentan características relacionadas con el metal, su geometría y sus dimensiones, la longitud de onda de iluminación y el medio circundante.

Podríamos visualizar el plasmón como una onda superficial que rueda por el mar de electrones de conducción del metal. Así como la energía de las ondas de la luz se presenta en unidades cuantificadas como partículas llamadas fotones, también lo es la energía transportada de este modo y las llamamos plasmones.

El papel predominante que desempeñan los plasmones localizados de superficie, PLS, es que pueden excitarse en metales, las propiedades dieléctricas de estos permiten que sostengan PLS en la región visible del espectro electromagnético, posibilitando así el aumento de las intensidades de las bandas Raman de las moléculas, adsorbidas en la superficie. [37]

4.2 PROPIEDADES SUPERFICIALES DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Las partículas metálicas presentan una interfase con cargas positivas debido a un defecto de electrones en los átomos de la superficie, que pasan al medio lo que afecta a la distribución de iones cerca de la región interfacial, ver **Figura 4.1**

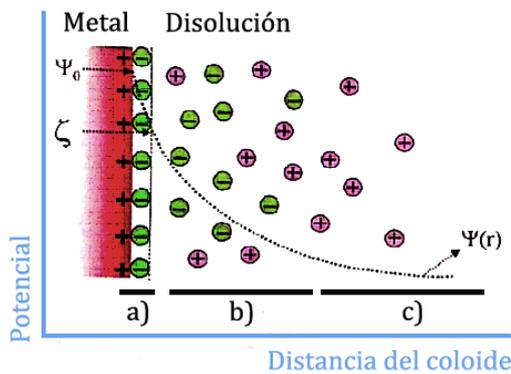


Figura 4.1

- a) **Capa de Stern**, integrada por iones rígidamente unidos a la superficie del metal.
- b) **Capa de difusión**, con iones de mayor movilidad
- c) **Doble capa eléctrica**, contraciones de la capa Stern y de difusión, cuyo espesor depende del tipo de concentración de los iones en solución y va disminuyendo gradualmente con la distancia.

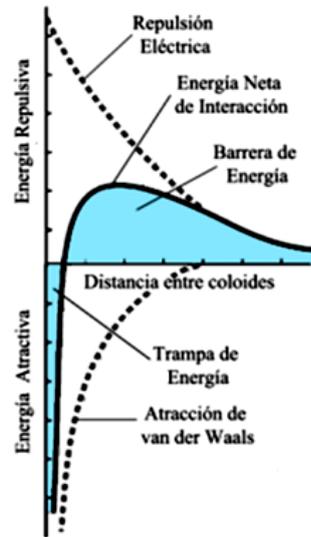


Figura 4.2

Figura 4.1: Distribución de iones sobre la superficie de la nanopartícula metálica y curva de potencial eléctrico (Ψ_0) en función de la distancia a la superficie, Ψ_0 es el potencial eléctrico en la superficie metálica y ζ el potencial en la capa de Stern, también llamado potencial zeta. Se puede medir y, por lo tanto, representa una manera efectiva de controlar el comportamiento de las NPs

Figura 4.2: Energías de atracción y repulsión entre dos partículas en suspensión y energía de interacción neta entre ellas.

La **Figura 4.1** representa una carga residual negativa que asegura la estabilidad de las nanopartículas en suspensión.

En la **Figura 4.2** se muestra la curva de energía resultante donde la energía neta de interacción, tiene un máximo correspondiente a la barrera potencial que las nanopartículas tienen que superar para poder aproximarse y agarrarse o adherirse. Está relacionado con el **potencial zeta** que puede disminuir absorbiendo una molécula neutra, o neutralizando la carga residual facilitando la agregación de nanopartículas. [35]

5. SOPORTES SERS

Los metales nanoestructurados que presentan plasmones más comunes, que pueden ser excitados por los láseres visibles utilizados en la espectroscopia Raman son la plata, el oro y el cobre. La plata es el sustrato universal por su amplia banda de resonancia plasmónica en la región visible – IR, su alta estabilidad y su fácil preparación.

Existen diferentes métodos por los que se pueden obtener nanopartículas metálicas en suspensión coloidal:

- Reducción química
- Fotorreducción
- Radiólisis utilizando una fuente de irradiación γ

5.1 COLOIDES METÁLICOS

Los coloides son un sistema intermedio entre las verdaderas disoluciones y las suspensiones groseras, integrados por nanopartículas de un determinado material en fase dispersa.

Lo que realmente caracteriza a las suspensiones coloidales es el tamaño de las partículas que está comprendido entre $200\mu\text{m}$ y un $1\mu\text{m}$. Las partículas coloidales en suspensión tienen el problema de su gran inestabilidad, tienden a precipitar con el tiempo. A la hora de preparar coloides se debe prestar especial atención su estabilización mediante diferentes métodos.

Los coloides poseen unas propiedades ópticas derivadas del tamaño de las partículas que poseen en suspensión, como la propiedad de dispersar la luz incidente por sucesivas reflexiones y refracciones en el efecto que se conoce como efecto Tyndall.

Las nanopartículas metálicas pueden ser consideradas como un estado intermedio entre un simple átomo y un material compacto.

Por otro lado el agua produce un espectro SERS muy débil, que permite el registro rutinario de moléculas solubles en ella sin que el disolvente interfiera. [37]

5.1.1 COLOIDES DE PLATA POR REDUCCIÓN QUÍMICA:

Con el tiempo, los coloides metálicos cambian sus propiedades, se utilizan inmediatamente después de ser preparados y como máximo hasta 3 semanas tras su preparación. En la literatura se han reportado diferentes métodos para la obtención de coloides de plata, los más utilizados son los métodos reportados por:

- Lee-Meisel: de una disolución acuosa de nitrato de plata (AgNO_3) empleando de reductor citrato trisódico, coloide color grisáceo y turbio con máximo de extinción a $\sim 420\text{ nm}$
- Leopold-Lendl: reducción con clorhidrato de hidroxilamina de una disolución de AgNO_3 , coloide color gris-amarillo oscuro y máximo de extinción a $\sim 405\text{ nm}$

- Método de Creighton: reducción con borohidruro sódico de una disolución de AgNO_3 , produciendo un coloide de color amarillotransparente con un máximo de extinción a $\sim 390 \text{ nm}$ [35]

5.2 FOTORREDUCCIÓN

La fotorreducción es el proceso de reducción de M^{p+} que puede inducirse mediante la irradiación con un láser de una disolución de una sal, que presente unión metálico (ver figura 5.1): $M^{p+} \xrightarrow{h\nu} M^0$ por medio de la irradiación se induce la radiólisis del agua de la disolución dando lugar a especies activas que inducen la reducción de los iones metálicos.

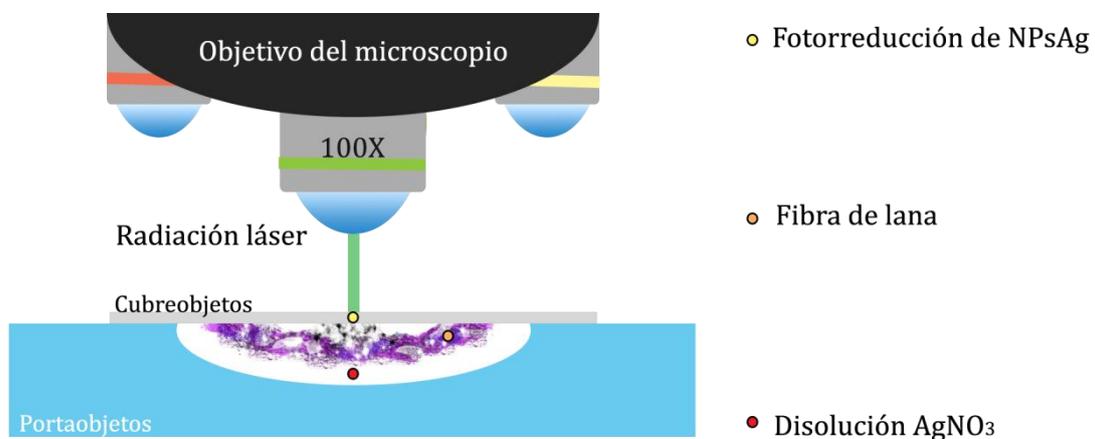


Figura 5.1: Montaje *in situ* para la fotorreducción de nanopartículas de Ag sobre una fibra.

El tamaño final de las nanopartículas aumenta con el tiempo de exposición al láser, la potencia del mismo y la concentración de iones metálicos. Se puede realizar *in situ* sobre el material de interés. [35]

6. ANTECEDENTES DE ANÁLISIS SOBRE LOS TINTES Y FIBRAS TEÑIDAS

HPLC

La identificación de pigmentos con frecuencia es llevada a cabo mediante la cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC, se trata de una técnica analítica muy sensible y específica pero que requiere de una gran cantidad de muestra, miligramos, que en muchas ocasiones resulta impensable para un objeto de interés cultural.

El problema fundamental que plantea HPLC es que este análisis debe disolver completamente el colorante sin cambiarlo o destruirlo. Esto no resulta un problema para los colorantes sintéticos normalmente, pero la lana se somete a una degradación extrema.

[1] [2]

ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

IR

Las fibras textiles suelen interferir demasiado en un espectro infrarrojo, ocultando las bandas espectrales de los colorantes, aunque los colorantes puros se pueden caracterizar fácilmente por su absorción IR. Existen pocos casos de análisis basados en IR aplicados a fibras textiles dada la imposibilidad de analizar el tinte directamente sobre la fibra y la necesidad de un pretratamiento invasivo con extracción de muestra.

Un ejemplo de la aplicación de Absorción Infrarroja sensibilizada en superficie o *Surface Enhanced Infrared Absorption*, SEIRA, es el análisis de un tinte sintético A07, después de la extracción de una fibra de lana teñida usando nanopartículas de oro producidas por ablación láser en solución.[3]

FT-RAMAN

El uso de la espectroscopia Raman mediante Transformada de Fourier con una fuente láser de infrarrojo cercano puede ser útil para extinguir la fluorescencia característica de los tintes, además también ha sido probada la posibilidad de investigación directa en sustrato. [7][8]

SERS

La aplicación de la Espectroscopia Raman intensificada por superficie, reduce considerablemente la cantidad de muestra necesaria, gracias a su alta sensibilidad y mejora de la señal Raman, además de conseguir extinguir la fluorescencia.

La posibilidad que ofrece la técnica SERS respecto a otras técnicas es el análisis de una sola molécula, hecho demostrado empíricamente utilizando como molécula de prueba el Cristal Violeta [9] y la Rodamina 6G [10], moléculas también utilizadas como colorantes sintéticos de textiles.

Cabe destacar algunos de los protocolos analíticos SERS mencionados en las publicaciones. Como por ejemplo los tratamientos previos de las muestras con coloides de citrato reducido y plata de hidroxilamina, de fácil preparación, uso y bajo costo.

Otro tipo de coloide de plata que es citado de Lee and Meisel, se trata de un sintetizado por microondas que proporcionado buenos resultados, con la ventaja de presentar una mejor estabilidad en un tiempo más largo y una alta reproducibilidad. [13][14][15]

Los coloides de plata presentan la ventaja de poder aplicarse también a las fibras, después de la centrifugación y eliminación del sobrante, el resultante es una pasta espesa que puede resultar más práctico para la aplicación en muestras pequeñas. [16][17]

Otro método eficaz para la detección de colorantes en las fibras textiles mencionado en la literatura es emplear un no gas-sólido extractivo por hidrólisis como pretratamiento, que se obtiene mediante la exposición de la muestra a vapores de ácido fluorhídrico, HF, en una microcámara cerrada. En el caso de colorantes mordientes, este procedimiento debe ser capaz de romper los complejos de tinte, que obstaculizan la detección del colorante. Si se añade una gota de coloide de plata a la fibra de la muestra se puede analizar por SERS. [13][18]

Un método alternativo es empleando micro-gotas de coloide de plata *in situ*, método propuesto por Benedetti, utilizando un sistema de inyección de tinta, que permite obtener una alta resolución espacial. El sistema puede ser directamente montado bajo un microscopio Raman. La cantidad de coloide depositado en el objeto es tan pequeña que la técnica se puede considerar como no destructiva. [19]

También existe la posibilidad de producir nanopartículas de plata por fotorreducción laser *in situ* sobre sustratos hidrófilos, en nuestro caso sobre la fibra textil, a partir de una solución de nitrato de plata en contacto con la muestra las nanopartículas de Ag son inmovilizadas directamente sobre la fibra, después de reducción por el efecto de la exposición a una rayo láser enfocado. El método ha sido aplicado con éxito para la identificación de colorantes mordientes en fibras de textiles históricos. [20][21]

6. OBJETIVOS

El análisis de fibras tiene un gran interés en el ámbito del patrimonio cultural, especialmente en la conservación de textiles, pero presenta varios problemas debido a su naturaleza química, baja concentración y a la complejidad de la matriz en los que se encuentra.

Este trabajo tiene como objetivo principal el estudio de la molécula de colorante BV1 en fibra mediante la espectroscopia Raman-SERS empleando diferentes tipos de nanoestructuras metálicas, con el fin de reducir al mínimo la cantidad de muestra necesaria para los análisis. En esta línea de investigación se aprovecha la versatilidad de la espectroscopía Raman para el análisis de los colorantes con toma de muestra pero *in situ*, es decir directamente sobre el sólido, la fibra y la disolución.

TAREAS ESPECÍFICAS

- Caracterización vibracional mediante FT-Raman de: BV1 sólido, BV1 en disolución acuosa y BV1 en una fibra teñida.
- Fotorreducción a diferentes λ de excitación de AgNO_3 para obtener NPs de Ag inmovilizadas sobre la fibra.
- Análisis SERS de la fibra teñida con BV1 a diferentes λ de excitación después de la fotorreducción.
- Análisis SERS del BV1 en disolución utilizando NPs de Ag en suspensión coloidal a diferentes λ de excitación
- Comparación de los espectros SERS del BV1 obtenidos por los distintos procedimientos mencionados anteriormente.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 REACTIVOS

El nitrato de plata ($\geq 99.0\%$), hidróxido sódico (99,998 %), y el clorhidrato de hidroxilamina (99 %) se adquirieron de Sigma-Aldrich. Todas las sustancias empleadas se encontraban en estado puro para el análisis. Para la realización de las disoluciones acuosas se empleó agua Milli-Q obtenida a partir de un sistema de purificación de agua Integral 3 de Milipore.

Tanto el colorante BV1 como la fibra fueron proporcionados por el Laboratorio de Microscopía Microquímica y Arte de diagnóstico (M2ADL) de Rávena por la institución The Rijksdienst voor het Cultureel Erfgoed (Amsterdam) en el marco del proyecto CHARISMA, a través de una colaboración existente entre el IEM-CSIC y Università di Bologna.

La muestra de colorante BV1 es parte de una selección de colorantes sintéticos históricamente documentados, en relación con el período de 1856 a 1900.

La fibra de lana teñida, está teñida mediante técnicas de tintura históricamente reales y envejecida naturalmente, pero en buenas condiciones (por estar protegidas de la luz). Las muestras se tomaron de Tabellarische Übersicht über die künstlichenorganischen Farbstoffe, un muestrario desarrollado por el Dr. Adolf Lehne en 1893, que contiene más de trescientas muestras de colorantes orgánicos sintéticos tempranos disponibles al final del siglo XIX, en forma de lana teñida sino también tiñen el algodón y seda.

7.1.2 PROTOCOLO EMPLEADO PARA TEÑIR LA FIBRA

La tinción es el proceso donde una fibra textil absorbe y retiene moléculas de colorante a partir de una solución. El objetivo es obtener una coloración uniforme de un sustrato, con un color preseleccionado, un tono, una fuerza y un brillo determinado.

En general, los textiles son teñidos por baños donde el colorante está presente por lo que el mismo debe de ser al menos parcialmente solubles en este baño, generalmente agua. Mediante movimientos o la subida de la temperatura se consigue la difusión del colorante en el baño de tinte.

La superficie de la fibra de lana es altamente hidrofóbica, en consecuencia se debe producir una difusión intercelular del colorante, pues pasan a través de los complejos proteínicos de la membrana celular, que son hinchados por el agua. Por último, el colorante se debe de fijar sobre la fibra, químicamente o físicamente. [26] [28] [29] [32] [33]

- A 750 ml agua desmineralizada se añaden 5g de sulfato de sodio y 150 mg del colorante en polvo, y posteriormente se calienta a 70°C.
- Al baño se añaden 10 g de lana merino previamente lavado con jabón neutro y aclarado, durante 30 minutos con una agitación baja.
- Se deja enfriar y se retira el exceso de colorante mediante un aclarado en agua desmineralizada.

7.2 EQUIPO INSTRUMENTAL

Todos los experimentos y técnicas espectroscópicas utilizadas en la realización de este trabajo se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto de Estructura de la Materia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IEM-CSIC), en Madrid (España).

UV-VIS

Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-VIS/NIR 3600 entre los intervalos de longitud de onda 250 nm y 1000 nm, con 0,5nm de resolución espectral. El procesamiento de los datos se realizó con los programas de computación OriginLab y Microsoft Excel.

FT-RAMAN

Se utilizó un espectrómetro FT-Raman MultiRAM Bruker modelo RFS 100/S equipado con una fuente de excitación Nd-YAG a 1064 nm, el detector de Ge de alta pureza es refrigerado con nitrógeno líquido. Los espectros se adquirieron con 4 cm^{-1} de resolución espectral y 500-1000 barridos, en el rango de 4000-100 cm^{-1} .

RAMAN Y SERS

Se utilizó un espectrómetro Raman Renishaw inVia junto con un microscopio óptico, Leica, equipado con un detector CCD refrigerado por Peltier y cuatro líneas de excitación con la emisión en 785 nm (láser de diodo), 532 nm (láser Nd-YAG con un doblador de frecuencia), 442 nm y 325 nm (láser de He-Cd).

Las mediciones se realizaron utilizando un filtro Rayleigh y diferentes rejillas que se acoplan a las diferentes fuentes de excitación laser: una rejilla de 1200 l / mm para la línea a 785 nm, 1800 l/mm a 532 nm y 2.400 l/mm en 442 nm. Los espectros se han registrado en el intervalo de número de ondas de 2000-100 cm^{-1} . Para el procesamiento posterior de todos los datos, se empleó el software OriginLab.

En la figura 7.1 se muestran los diferentes tipos de equipos instrumentales empleados.



Figura 7.1: (a) Espectrómetro UV-VIS (b) Espectrómetro FT-Raman (c) Espectrómetro Raman

7.3 MÉTODOS

7.3.1 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

FOTORREDUCCIÓN

Las nanopartículas de plata obtenidas por el método de fotorreducción se prepararon a partir de una disolución de AgNO_3 en agua tridestilada Milli-Q, de concentración 10^{-2}M . La fotorreducción se realizó empleando diferentes líneas de excitación: 442 nm y 532nm. El microscopio confocal equipado con un objetivo 100x acoplado a una cámara de vídeo. Este método fue desarrollado previamente en el laboratorio. [39] [40].

COLOIDE DE PLATA

El colide de plata (AgHxCl) obtenido por reducción química de una disolución de AgNO_3 con clorohidrato de hidroxilamina se preparó siguiendo el método de Leopold-Lendl modificado siguiendo las pautas que se muestran a continuación:

- A 90 mL de disolución de hidroxilamina ($\text{H}_3\text{NO.HCl}$) en agua Milli-Q a una concentración 0,0016M, se añaden 300 μL de disolución de hidróxido sódico (NaOH) en agua Milli-Q a una concentración 1M. Bajo fuerte agitación se añaden 10 mL de disolución de nitrato de plata (AgNO_3) en agua Milli-Q a una concentración 0,01M gota a gota. Se deja agitando durante 15 min. a temperatura ambiente.

La disolución resultante, el coloide de AgHxCl , tiene un color amarillento con tornasoles rojizos y presenta un máximo de extinción del plasmón UV-VIS entre 400-410 nm y un pH ~ 6 .

7.3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS, DILUIDAS Y EN FIBRA

FT-RAMAN Y RAMAN NORMAL

Para realizar los experimentos FT-Raman se utilizaron dos soportes diferentes en dependencia de estado físico de la muestra analizada. El sólido se colocó entre dos pastillas de fluoruro de calcio (figura 7.1-a) transparente a la radiación infrarroja ($\lambda_{\text{exc.}} = 1064\text{nm}$), debido a la poca cantidad de muestra con la que se contaba. La fibra teñida con BV1 se depositó en un soporte de aluminio con un pocillo en el centro (figura 7.1-b) y se procedió al análisis.

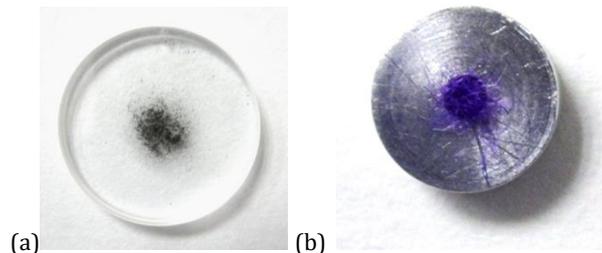


Figura 7.2: (a) Preparación del sólido BV1 en FT-Raman entre pastillas de fluoruro de calcio. (b) Preparación de la fibra teñida con BV1

Para obtener los espectros Raman normal no se necesita ningún tipo de preparación previa de la muestra, simplemente se toma una pequeña fracción del compuesto en estado sólido, se coloca sobre un portaobjetos, como se muestra en la **Figura 7.2** y se procede a su análisis.

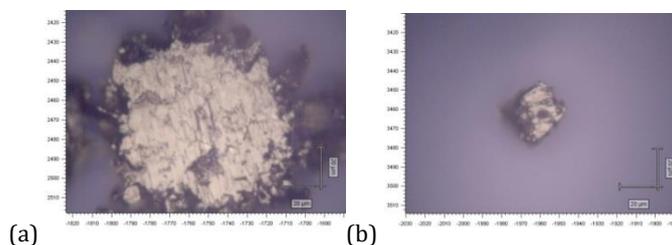


Figura 7.3: (a-b) Fotografías de una muestra en estado sólido de BV1 a una magnificación de 50x

Es fundamental controlar los parámetros de intensidad y potencia del láser, así como el tiempo de exposición a la radiación láser, pues la muestra se puede deteriorar (calcinar) si no son los parámetros adecuados, ver **Figura 7.3**

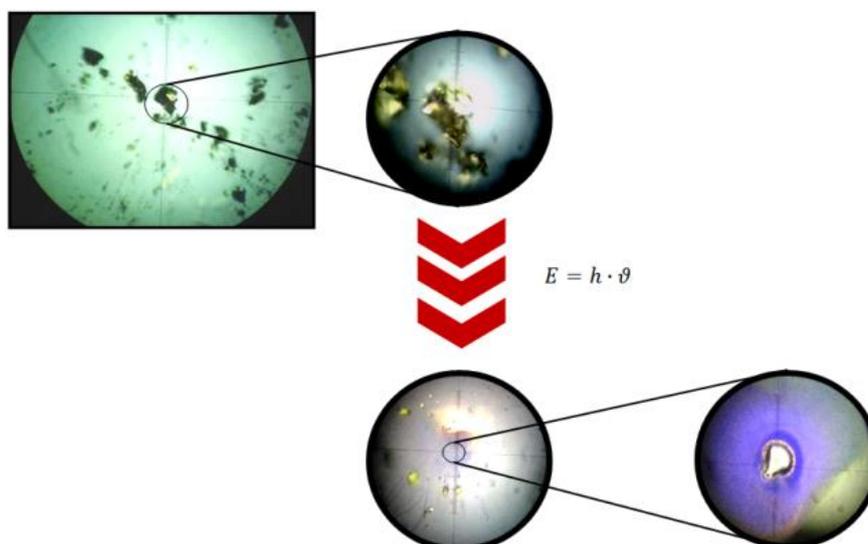


Figura 7.4: Molécula de BV1 calcinada

En la **Figura 7.4** se muestra un ejemplo de deterioro de un grano de muestra sólida BV1, donde se ha utilizado una potencia de láser muy alta, $\lambda_{exc.} = 532 \text{ nm}$ y 15 minutos de exposición a la radiación láser.



La concentración de la disolución empleada en este proceso es de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ con el fin de evitar la saturación del espectro en FT-Raman, una técnica muy sensible que necesita poca concentración.

Figura 7.5. (a) Fotografía de la disolución madre 10^{-2} M BV1

SERS

FOTORREDUCCIÓN SOBRE FIBRA

Para analizar las muestras, utilizando la técnica SERS, la misma necesita ser montada sobre un cubreobjetos, para ello se toma una única fibra de la lana de merino teñida y se adhiere a este soporte mediante cinta de doble cara, se monta sobre un portaobjetos y se procede a su análisis en los puntos marcados previamente con rotulador permanente en el portaobjetos por el anverso de la muestra, como se muestra en la **Figura 7.6-a**.

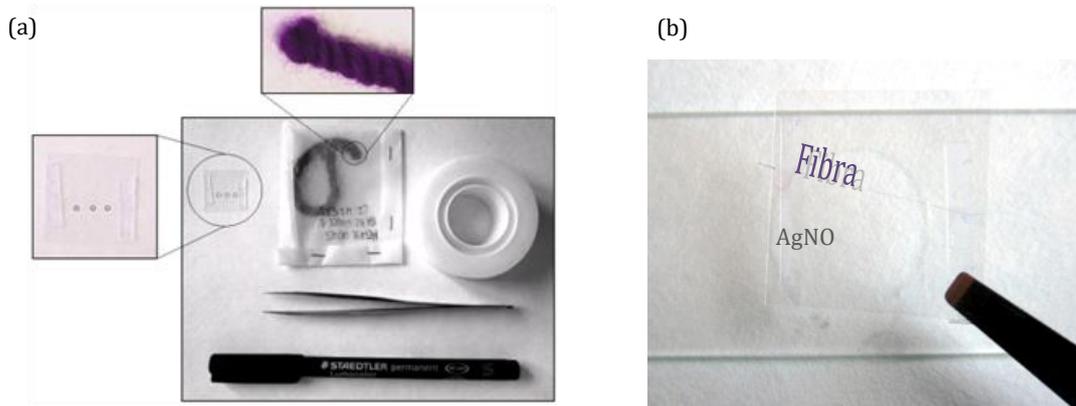


Figura 7.6: (a) Útiles para la preparación de la muestra y (b) montaje final para medir mediante SERS por fotorreducción de fibra BV1.

El portaobjetos empleado es cóncavo y se le añaden unas gotas de nitrato de plata (AgNO_3) con una concentración 10^{-2} M, como se muestra en la figura 7.6-b. Se coloca la muestra en el portaobjetos con la fibra directamente en contacto con la disolución y se procede a la fotorreducción a diferentes líneas de excitación láser (442 y 532 nm) para ser analizada con posterioridad. Durante dicho proceso se debe evitar la formación de aire en forma de burbujas entre las dos interfaces líquido-cubreobjeto, ya que puede interferir en el análisis.

Las imágenes TEM mostradas en este trabajo han sido realizadas con anterioridad para el proyecto CHARISMA, a través de la colaboración con la Università di Bologna.

SERS EN COLOIDE DE PLATA

Se añade 1 μL de disolución de BV1 a 5 mM y a 1 mL coloide de AgHxCl para obtener una concentración final de BV1 de 5 μM . La técnica SERS es capaz de detectar una única molécula y necesita muy poca concentración de analito.

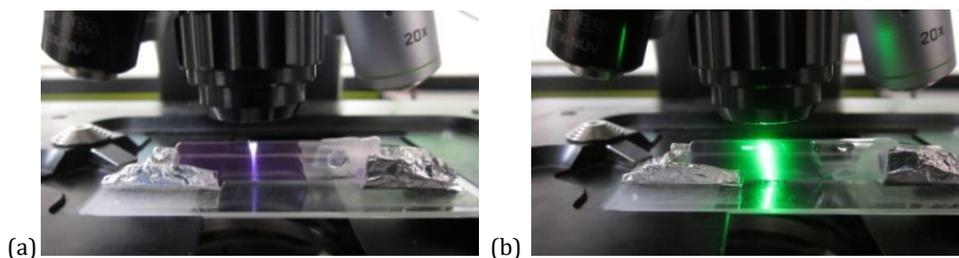


Figura 7.7: (a) Enfoque con luz blanca en el centro la disolución de coloide de AgHxCl y colorante BV1 (b) Medición de la disolución a $\lambda \text{ exc.}=532 \text{ nm}$

La **Figura 7.7-a** muestra como debe de estar enfocado el láser, para las mediciones de BV1 en coloide, en el centro de la disolución formando una figura semejante a un reloj de arena.

UV-VIS

Las muestras para espectroscopía UV-Vis en disolución acuosa se prepararon por dilución de una muestra madre de BV1 hasta obtener una concentración final de 10^{-5} M.

Los espectros UV-Vis de las suspensiones coloidales se midieron diluyendo dicha suspensión hasta un 20% en agua, como se muestra en la **Figura 7.8**.

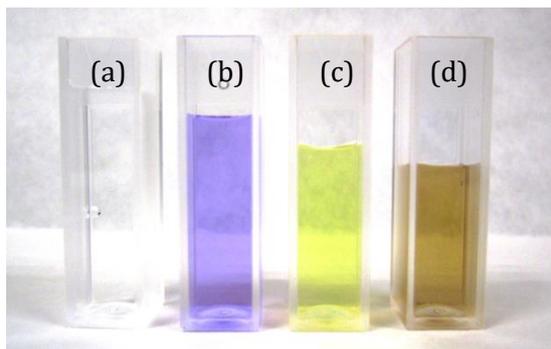


Figura 7.8: Preparación de diluciones para los análisis UV-Vis:

- (a) El blanco, H_2O
- (b) Disolución de BV1 a 10^{-5} M en 3 ml H_2O
- (c) Disolución de AgHxCl en H_2O al 20%
- (d) Disolución al 20% en H_2O del colorante BV1 a $5 \mu\text{M}$ en presencia del coloide de AgHxCl

7.3.3 SERS EN FIBRA POR FOTORREDUCCIÓN

Una parte muy importante en esta investigación se centra en estudiar el colorante BV1 sobre la fibra mediante fotorreducción, sin lugar a duda una de las partes más laboriosas y que requiere de una explicación detallada.

Las NPs de plata preparadas para fotorreducción se obtuvieron según el esquema presentado en la **Figura 5.1** y teniendo en cuenta los trabajos realizados con anterioridad en el Instituto de la Estructura de la Materia de Madrid.

Como por ejemplo los llevados a cabo por Francesca Gallazzi [36] que demuestra si la irradiación/fotorreducción se realiza a $\lambda_{exc}=442\text{nm}$ las nanopartículas que se forman permiten realizar el análisis de los espectros SERS a diferentes longitudes de onda de irradiación (442, 532 y 785 nm) mientras que si irradian a 532 nm solo se puede realizar el espectro SERS a 532nm.

De esta forma cuanto más baja sea la λ_{exc} que se emplee en la fotorreducción más opciones de realizar SERS a diferentes longitudes de onda se tendrán y mayor número de datos comparables entre sí para observar diferentes comportamientos de la molécula sobre las NPs fabricadas.

Aun así en este trabajo se ha modificado y adaptado a las necesidades impuestas por la detección del colorante en la fibra, como puede ser el caso de concentraciones de AgNO_3 más altas (10^{-2} M) o tiempos de irradiación más cortos ($>60\text{sg}$). Se usaron las líneas láser 442nm y 532nm, el objetivo de focalización 100x y la potencia láser de en la muestra $\approx 0,3$ mW. En ningún caso ni durante la irradiación o la medición la potencia empleada excederá 1-5 % de la potencia del láser de $\lambda_{exc}=442\text{nm} / 532\text{nm}$, el tiempo empleado en todos los casos es inferior a un minuto para evitar la evaporación de la disolución de AgNO_3 , pues

recordemos que con la radiación 442nm pertenece a un láser cercano al UV que presenta gran energía.

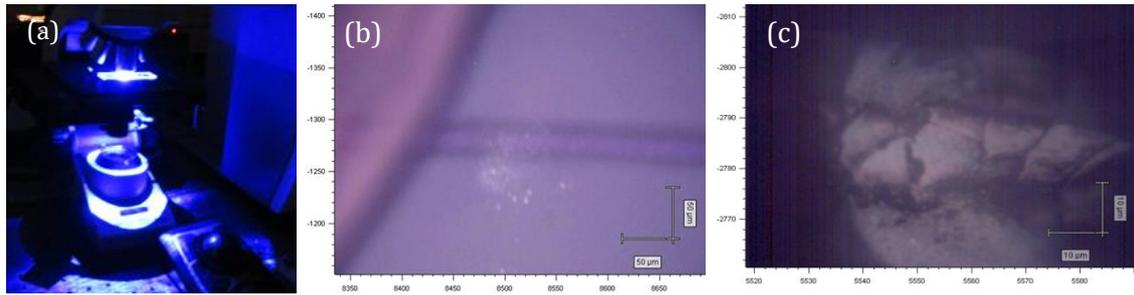


Figura 7.9: (a) Fotorreducción láser irradiando a $\lambda_{exc.}=442nm$ (b) Fotografía 20x de NPsAg fotorreducidas, fibra y permanente (c) Fotografía 100x de NPsAg depositadas sobre la fibra (dándoles brillo).

En la **Figura 7.9** se enseñan Nanopartículas de plata crecidas a $\lambda_{exc.} = 442$ con potencia 50% durante 15 segundos así como diferentes puntos de enfoque de la muestra para fotorreducir encima y sobre la fibra.

Uno de los problemas más complicados que presenta la fotorreducción es el enfoque para irradiar y para medir la muestra, la solución vino de la mano de Zuzana Jurasekova, licenciada en física quien realizó su tesis doctoral en estudio de flavonoides. [35]

Se ha comprobado que el método que dio mejores resultados en los análisis SERS se corresponde con un enfoque para crecer nanopartículas realizado entre el cubreobjetos y la fibra teñida, con el fin de no quemar la lana de merino. Para el caso de la medición por el contrario, se enfoca el láser hasta que se alcance un equilibrio entre la fibra y las NPsAg sin enfocar ninguno en concreto. Empleando potencias altas durante tiempos cortos.

Para tener unos resultados reproducibles es recomendable realizar las medidas en al menos 3 puntos diferentes de la muestra pues las medidas en *micro* son medidas puntuales y pertenecen a un área muy pequeña de la muestra $\sim 1 \mu m^2$. Además antes y después de cada medida las muestras fueron observadas con microscopio óptico para controlar la posible degradación de los mismos por el haz láser.

Los parámetros empleados para la foto-medición sobre la fibra a diferentes $\lambda_{exc.}$ Se muestran en la **Tabla 7.1**

$\lambda_{EXC.}$ (NM)	TIEMPOS (SEG.)						POTENCIAS (%)				
442	10	20	30	40	50	60	0,1	0,5	1	5	10
532	20	30	40	50	60	120	0,5	1	5	10	50

Tabla 7.1

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

La **Figura 8.1-a** muestra los espectros extinción de la molécula de colorante BV1 en disolución acuosa junto con los espectros de extinción del coloide de NPs de Ag en ausencia (**Figura 8.1-b**) y presencia (**Figura 8.1-c**) de la molécula de BV1 a una concentración de $5\mu\text{M}$. Los resultados obtenidos mediante espectrofotometría UV-visible en presencia de NPs metálicas de Ag, muestran que la molécula de BV1 ejerce un efecto agregante coloide de Ag, como se muestra en la resta de espectros de la **Figura 8.1-b**.

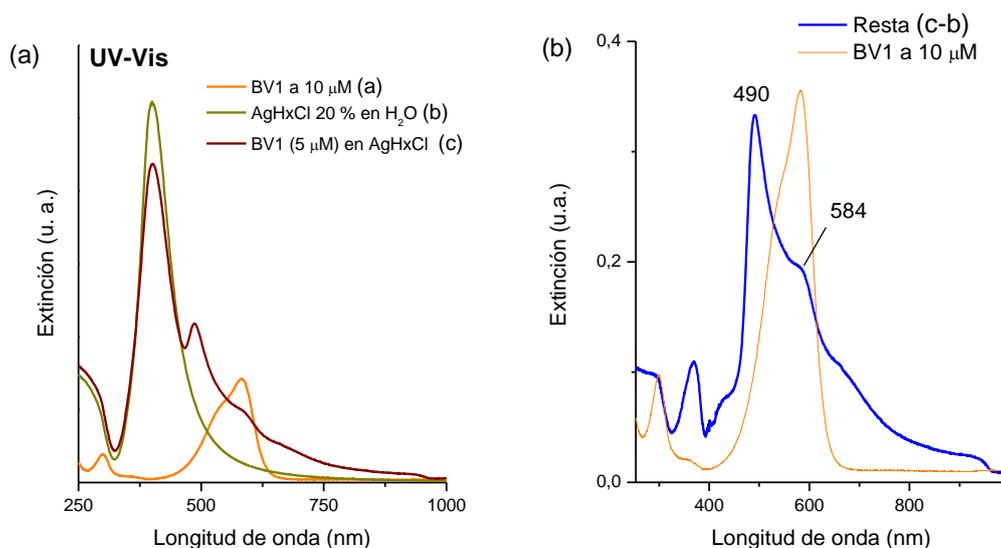


Figura 8.1: Espectros de extinción de la molécula BV.

Si se analizan las bandas de extinción que se encuentran alrededor de los 490 y 588 nm (**Figura 8.1-b**), en el espectro resta correspondiente a los espectros de extinción del coloide y coloide más colorante, se puede observar el efecto agregante anteriormente mencionado, debido a que en la literatura se ha reportado la presencia de dímeros y trímeros de nanopartículas en este rango de longitudes de onda (500-600 nm). [45] [46] [47] [48]

8.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

ESPECTROS RAMAN CON DIFERENTES COMPORTAMIENTOS.

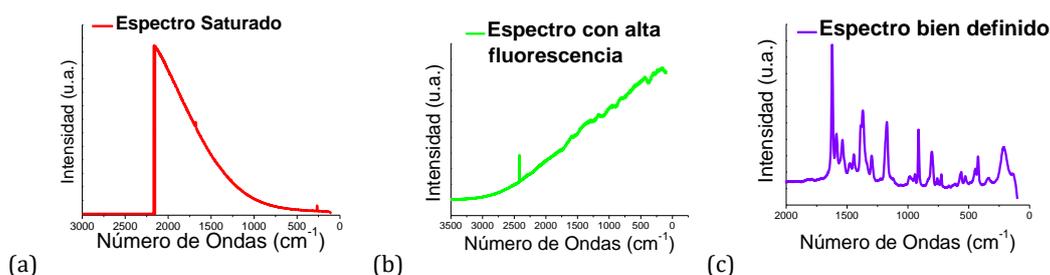


Figura 8.2: Posibles aspectos de los espectros

El espectro de la **Figura 8.1-a** muestra un perfil saturado, este hecho se debe a que la alta fluorescencia intrínseca que a menudo presentan los colorantes nos impide ver las bandas Raman de la molécula, pues son procesos que compiten entre sí.

El segundo espectro (**Figura 8.2-b**) presenta una alta fluorescencia impidiendo ver algún pico con intensidad definida que permita caracterizar la molécula de colorante. El último espectro (**Figura 8.2-c**) presenta unas bandas bien definidas con una alta relación señal/ruido que pertenecen a la molécula objeto de estudio. Este tipo de espectro es el que se persigue en la toma de medidas.

8.2.1 FT-RAMAN Y RAMAN NORMAL

Para caracterizar el colorante BV1 en diferentes estados (sólido, disolución acuosa y tiñendo una fibra) se utilizó la técnica FT-Raman. El uso de una fuente de excitación en la región espectral del infrarrojo cercano a 1064 nm, disminuye la emisión de fluorescencia característica de estos colorantes. Logrando así, la obtención de espectros con una buena relación señal/ruido de las muestras a analizar.

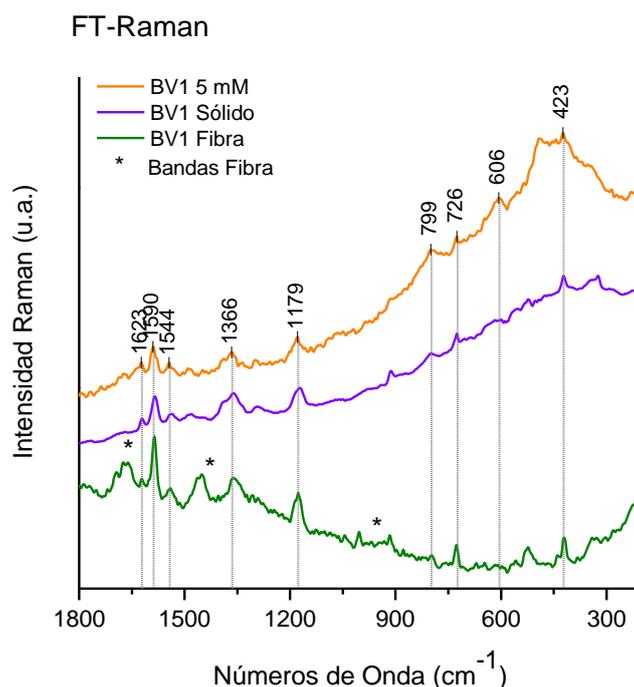


Figura 8.3: Espectros FT-Raman del BV1 en sólido, fibra y disolución.

Considerando el hecho de que las interacciones entre las moléculas de colorante y las fibras de lana son principalmente de tipo electrostático-iónico, no se espera observar muchos cambios en la posición de las bandas espectrales entre el colorante en sólido puro y el colorante en la fibra de lana. Las diferencias en las intensidades relativas están posiblemente relacionadas con su orientación sobre el sustrato. Las moléculas del

colorante en la muestra sólida se orientan "aleatoriamente", mientras que, una vez adsorbido en la fibra, tendrán una orientación "preferente" de acuerdo con la posición de las moléculas del colorante, determinado por la ubicación de los grupos funcionales, que interactúan entre la molécula y la fibra de lana. [36]

En la **Figura 8.3** se observa una gran fluorescencia correspondiente al colorante BV1 a las líneas de excitación $\lambda_{exc.} = 532$ y 785 nm, en general las sustancias fluorescentes absorben energía en forma de radiación electromagnética de onda corta: UV, luz azul y posteriormente la emiten a una longitud de onda más larga.

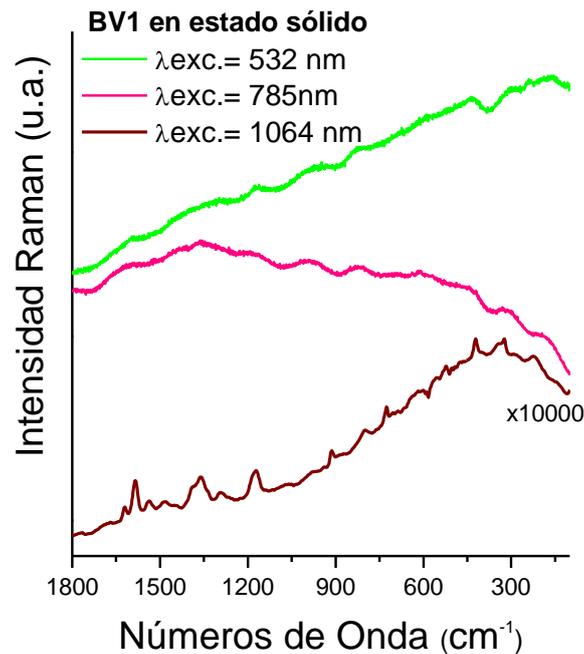


Figura 8.4: Espectros Raman-normal del BV1 a diferentes longitudes de onda de excitación ($\lambda_{exc.} = 532, 785$ y 1064 nm)

En consecuencia los ejemplos más notables de fluorescencia ocurren cuando la luz absorbida se encuentra dentro del rango UV del espectro, por esta misma razón se recurre a la longitud de onda lo más cercana al IR posible, es decir en nuestro caso el láser de longitud de onda 1064 nm, proporciona mejores resultados.

8.3 SERS

El estudio SERS del colorante BV1 se realizó utilizando nanopartículas de plata obtenidas por diferentes métodos de fabricación:

- Fotorreducción
- coloides metálicos

A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada una de los sustratos empleados.

8.3.1 SERS POR FOTORREDUCCIÓN

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA FOTORREDUCCIÓN

Se ha comprobado experimentalmente que el mejor tiempo y potencia para no dañar el soporte y medir la fibra teñida a $\lambda_{exc} = 442 \text{ nm}$ es un tiempo de 40sg y una potencia de 0.3 mW para ello se ha analizado la banda del carbono que aparece a 1600 cm^{-1} , esta banda actúa como marcador indicando si la fibra está quemada por la potencia del láser y por tanto deteriorada para su análisis.

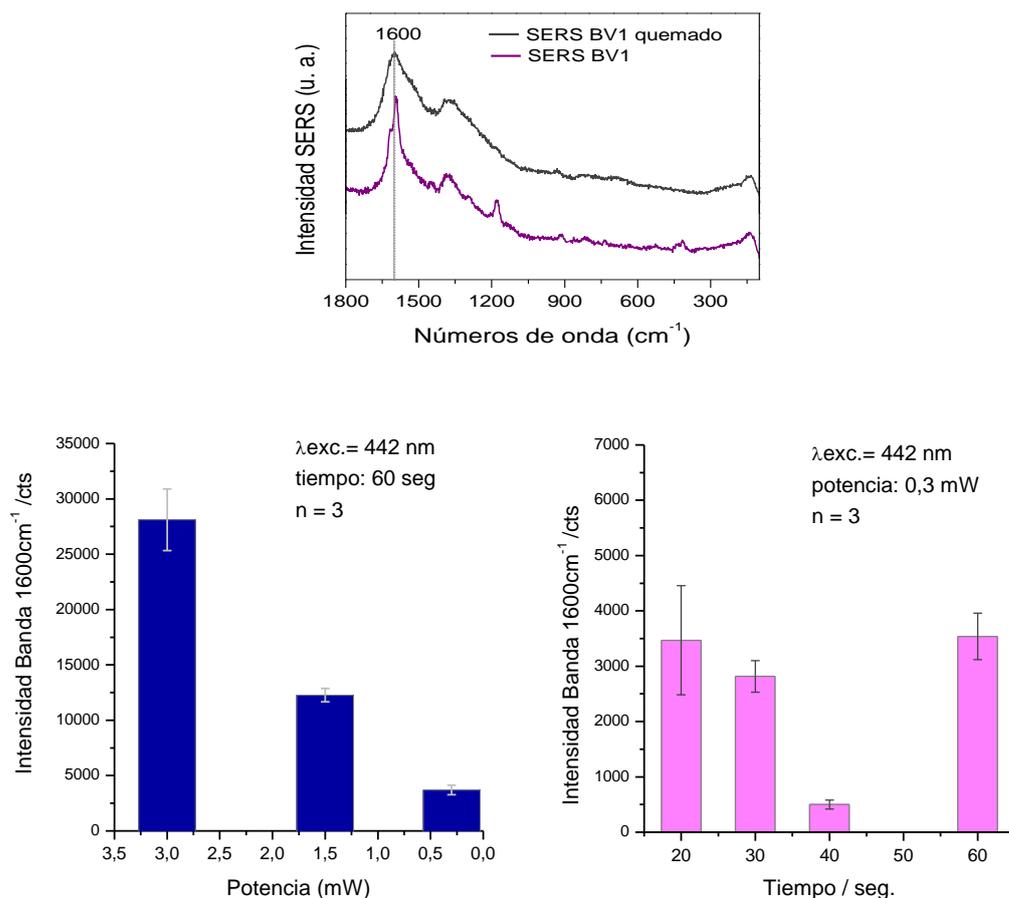


Figura 8.5: Gráficas realizada a partir del registro de espectros a diferentes condiciones, que muestra la optimización de condiciones para la $\lambda_{exc} = 442 \text{ nm}$.

EFFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA DE EXCITACIÓN

Para estudiar mejor los cambios químicos que ocurren se han obtenido espectros SERS a diferentes longitudes de onda. Este estudio está justificado por el hecho de que las diferentes especies absorbidas sobre la superficie se pueden estudiar selectivamente a diferente longitud de onda de excitación en función de su diferente resonancia.

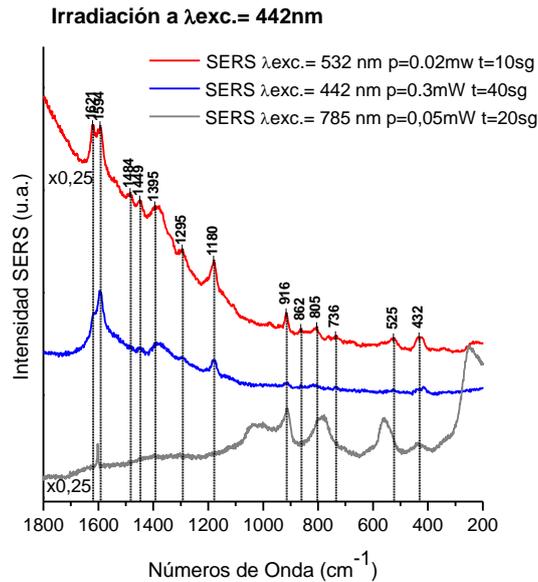


Figura 8.6: Espectros irradiados a $\lambda_{exc}=442\text{nm}$ y medidos a diferentes $\lambda_{exc}=442\text{nm}, 532\text{nm}, 785\text{nm}$.

Las nanopartículas crecidas mediante la fotorreducción con la excitación a 442 nm han sido medidas utilizando diferentes puntos de enfoque, dentro de la fibra y fuera de la fibra (cerca del cubreobjetos), pues con esta longitud de onda láser tan potente se necesitan pocas NPAg para conseguir un buen efecto SERS. Los mejores resultados SERS obtenidos para la excitación a 442 nm se dieron cuando el enfoque del láser se realizó dentro de la fibra. Las NPs formadas en esta zona son de menor tamaño (ver **Figura 8.6**), por lo que tienen una resonancia del plasmón a menor longitud de onda lo que va a dar espectros con una mejor calidad (relación señal/ruido) a longitudes de onda más bajas (ej. $\lambda_{exc}=442\text{nm}$).

A continuación se muestran unas imágenes del microscopio electrónico de transmisión TEM, por sus siglas en inglés *Transmission Electron Microscopy*, en la **Figura 8.7** y **Figura 8.8**:

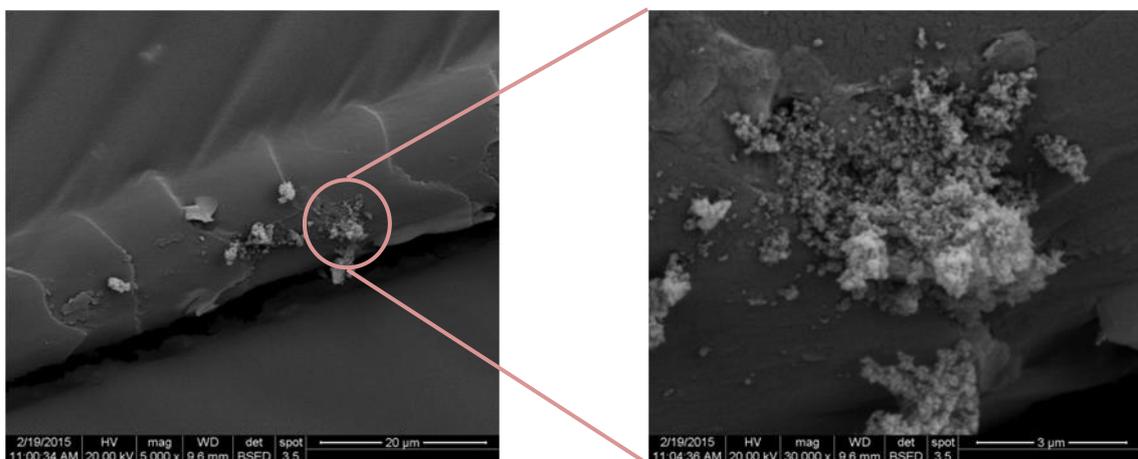


Figura 8.7: Nanopartículas de Plata Fotorreducidas 442 nm a una potencia láser 1,5 mW de y un tiempo de 2 minutos sobre la fibra teñida de BV1.

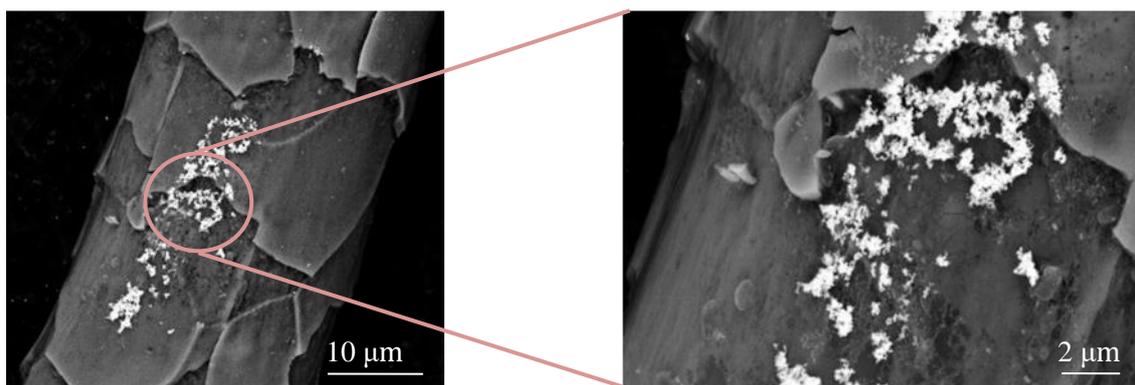


Figura 8.8: Nanopartículas de Plata Fotorreducidas 532 nm a una potencia láser 0,5 mW de y un tiempo de 20 minutos sobre la fibra teñida de BV1.

Sin embargo, al ser más energética la línea de excitación 442 nm la fotorreducción a un enfoque fuera de la fibra, es decir, en la interfase fibra-cubreobjeto, da lugar a NPs con una mayor dispersión de tamaños. Este efecto produce NPs con resonancias plasmónica en un amplio rango del espectro y permite el análisis SERS con otras líneas de excitación menos energéticas, (ej. $\lambda_{exc.}=532$ y 785 nm) ver **Figura 8.6**

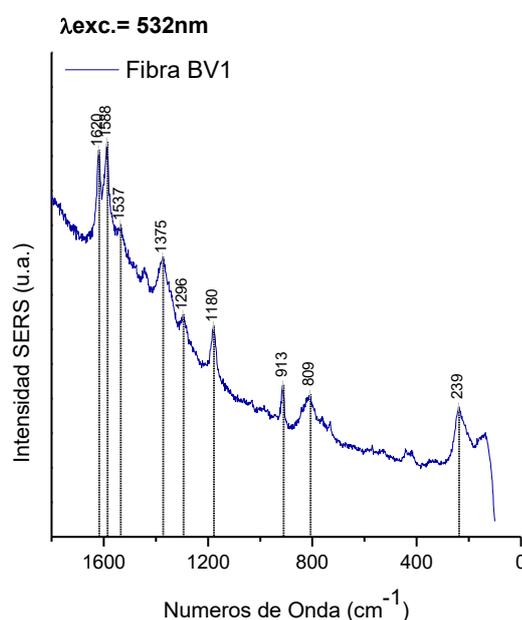


Figura 8.9: Espectro irradiado a $\lambda_{exc.}=532$ nm a una potencia de 10,6 mW durante un tiempo 5sg y medido a 532nm a una potencia de 1 mW durante un tiempo 10sg.

Al medir con el láser de 532 nm las nanopartículas crecen con un mayor de mayor tamaño y en esta ocasión enfocando sobre la fibra, pues para esta medición se necesitan más aglomerados de nanopartículas y con mayor tamaño (ver **Figura 8.8**) que presenten la resonancia del plasmón adecuada para el rango de λ de interés. Si se mide en el interior

aparece mucha fluorescencia típica del colorante por el escaso número de NPAg y no se produce efecto SERS.

8.3.2 SERS EN COLOIDE DE PLATA

La **Figura 8.7** muestra los espectros SERS del BV1 en coloide de plata (AgHxCl) utilizando dos líneas de excitación diferentes (532 y 785 nm).

Cuando el colorante se pone en contacto con el coloide de plata se aprecia un cambio en la coloración del coloide producto de la acción del colorante que ejerce un efecto agregante sobre las NPs. Este efecto se puede corroborar también mediante las medidas de extinción vistas con anterioridad en el *apartado 8.1*, **Figura 8.1-a** y **Figura 8.1-b**. La agregación de las NPs por la acción del colorante permite la obtención de un buen espectro SERS de la molécula de BV1 a $\lambda_{exc.} = 785$ nm, ver **Figura 8.10**

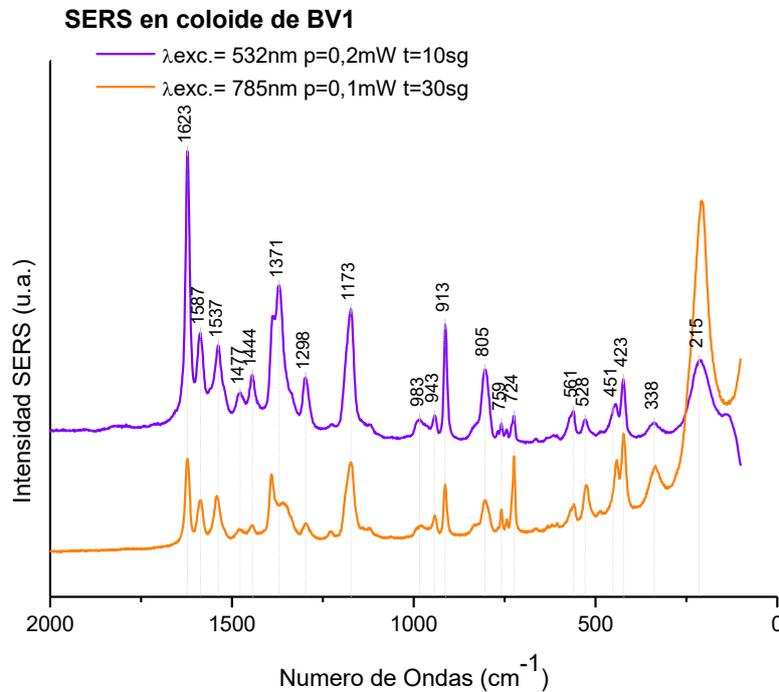
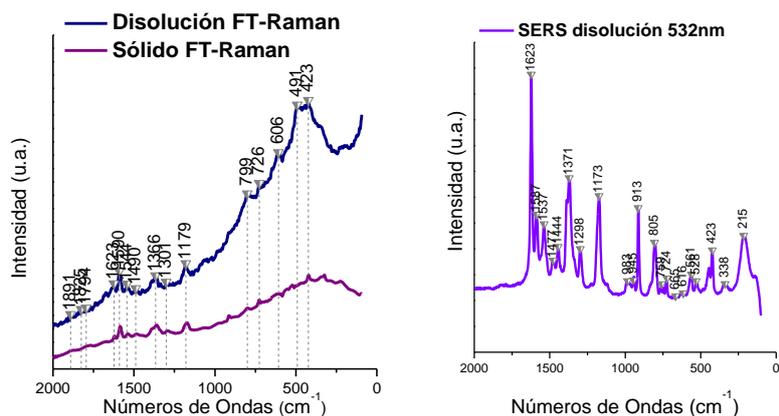


Figura 8.10: Espectros SERS del BV1 en coloide de plata, AgHxCl, utilizando $\lambda_{exc.} = 532$ y $\lambda_{exc.} = 785$ nm

ASIGNACIÓN DE BANDAS



FT-Raman Sólido	FT-Raman Disolución	SERS Disolución 532nm	Asignación de Bandas*	Intensificación de las bandas
1621	1623(25)	1623 (100)	ν C=C anillo aromático	*****
1584 (50)	1590(50)	1587 (50)	ν C=C anillo aromático	**
1536	1544(25)	1537 (50)	ν C=C anillo aromático	**
1482	1490	1477(25)	δ CH ₃	*
	1449	1444(75)	δ CH ₃	***
1360 (50)	1366(50)	1371 (50)	C(Anillo)-N	****
1293	1301(25)	1298(75)	ν C-N	****
1171 (50)	1179	1173(25)	δ CH en el plano	*
	1050	983	δ CH anillo	*
		945(75)	ν C del anillo	****
913(25)		913 (50)	ν _s (Anillo), ν C(Anillo)-N, (Anillo)ZN(CH ₃) ₂	**
		805(25)	δ CH anillo	**
799	799(25)	759(25)	Vibraciones del esqueleto de la molécula	*
726(25)	726(25)	724		
	606(50)	665		
		616(25)		*
		561(25)		*
522	491(50)	528		
421(25)	423(50)	423 (50)	δ (CNC)/ δ (CCC)	***
323(25)		338(25)	γ (CNC)	*
227	186(50)	215 (50)	ν N-Ag	**

*Doherty B., A vibrational spectroscopic and principal component analysis of triarylmethane dyes by comparative laboratory and portable instrumentation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121, 2014

El espectro FT-Raman de sólido muestra poca intensidad en sus picos, pues está tapada por su alta fluorescencia, en cambio en el FT-Raman disolución la intensificación es algo mayor porque la fluorescencia ha bajado. Sin duda el espectro SERS de la disolución medido a $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$ es el más claro y del que se puede extraer más información.

El Espectro SERS muestra unas bandas muy intensas sin apenas fluorescencia, en él se puede apreciar una intensificación fuerte en muchas de sus bandas respecto a los espectros FT-Raman, esto nos indica como la molécula esta interactuando con las NPsAg.

9. CONCLUSIONES

Se ha logrado caracterizar las bandas propias del BV1 en sólido, disolución y sobre soporte de lana, lo que permite obtener una caracterización básica de la forma que presenta la molécula en dichos medios.

Este estudio permitirá la comparación de los espectros obtenidos en este trabajo con los que puedan existir en una obra histórico-artística real, e identificar el colorante BV1 aunque se encuentre en un estado de degradación.

Además de ello también en el presente trabajo se han llegado a otro tipo de conclusiones como son:

- La molécula BV1 tiende a agregarse en presencia del coloide formando dímeros y trímeros.
- Las nanopartículas producidas 442 nm tienen diferente morfología y presentan una mayor superficie de absorción de resonancia de plasmones en comparación con las nanopartículas generadas con longitudes de onda más altas. [36]
- La molécula BV1 interactúa con las NPsAg principalmente por sus grupos: $\nu\text{C}=\text{C}$ del anillo aromático, $\text{C}-\text{N}$ del anillo, $\nu\text{C}-\text{N}$ y νC del anillo, lo que la sitúa sobre el metal de forma horizontal.

10. CLAUSURA

En investigación en patrimonio siempre es de especial interés los análisis no-invasivos, es decir sin toma de muestra, pues resulta menos agresivo para la obra.

Pero no siempre es suficiente con estos análisis y se debe acudir a análisis químicos que requieren toma de muestra para una investigación más profunda, en cualquier caso la fracción de muestra que se requiere suele ser mínima alcanzando el nivel de micro-destructividad que puede ser considerado "aceptable" para un objeto artístico o histórico, esto se debe al aumento de la sensibilidad de los métodos aplicados aunque la fracción de muestra requerida en muchos casos también depende de la habilidad del técnico de laboratorio.

El uso de este tipo de técnicas de espectroscopia vibracional se está extendiendo cada vez más en el campo del patrimonio artístico y arqueológico por la facilidad de obtener un buen espectro Raman de una muestra pequeña, sin ningún tipo de manipulación.

Se usa Raman fundamentalmente para conocer los pigmentos y la composición molecular de muchos de los materiales constituyentes, con el principal fin de poder realizar un diagnóstico previo a una posible restauración, para la detección de falsos históricos o falsificaciones, peritaje, e incluso en la identificación y datación.

Con esta técnica espectroscópica ya se ha analizado el impacto de la contaminación urbana sobre las esculturas metálicas de Eduardo Chillida, así como se ha diagnosticado el estado de conservación de las pinturas en las excavaciones de Pompeya o la degradación que producen las partículas aéreas en la Alhambra de Granada. [37]

11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.R. van Bommel, Ina Vanden Berghe, Alexander M. Wallert, Rene Boitelle, Jan Wouters, High-performance liquid chromatography and non-destructive threedimensional fluorescence analysis of early synthetic dyes, *Journal of Chromatography A*, 1157, 2007.
- [2] Christa L. Brosseau, Alessa Gambardella, Francesca Casadio, Cecily M. Grzywacz, Jan Wouters and Richard P. Van Duyne, Ad-hoc Surface Enhanced Raman Spectroscopy Methodologies for the Detection of Artist Dyestuffs: Thin Layer Chromatography-Surface Enhanced Raman Spectroscopy and in Situ on the Fiber Analysis, *Analytical Chemistry*, 81, 2009.
- [3] Silvia Prati, Marta Quaranta, Giorgia Scitutto, Irene Bonacini, Lucio Litti, Moreno Meneghetti and Rocco Mazzeo Use of nano gold obtained by laser ablation for SEIRA analyses of colorants, *Heritage Science*, 2, 2014.
- [4] Francesca Casadio, Marco Leona, John R. Lombardi and Richard Van Duyne, Identification of organic colorants in fibers, paints, and glazes by surface enhanced.
- [5] Nadim C. Scherrer, Zumbuehl Stefan, Delavy Françoise, Fritsch Annette, Kuehnen Renate Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints: Raman spectra reference collection, *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73, 2009.
- [6] P. Vandenabeele, L. Moens, H. G. M. Edwards and R. Dams, Raman spectroscopic database of azo pigments and application to modern art studies, *Journal of Raman Spectroscopy*, 31, (2000).
- [7] F. Casadio, K. Mauck, M. Chefitz, R. Freeman, Direct identification of early synthetic dyes: FT-Raman study of the illustrated broadside prints of José Gaudalupe Posada (1852 –1913), *Applied Physics A*, 100, 2010.
- [9] K. Kneipp, Katrin Kneipp, Yang Wang, Harald Kneipp, Lev T. Perelman, Irving Itzkan, Ramachandra R. Dasari, and Michael S. Feld, Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Physical Review Letters*, 78(9), 1997.
- [8] N.G. Greeneltch, Nathan G. Greeneltch, Amber S. Davis, Nicholas A. Valley, Francesca Casadio, George C. Schatz, Richard P. Van Duyne, and Nilam C. Shah, Near-Infrared Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (NIR-SERS) for the Identification of Eosin Y: Theoretical Calculations and Evaluation of Two Different Nanoplasmonic Substrates, *The Journal of Physical Chemistry A*, 156, 2012.
- [10] Shuming Nie, Steven R. Emory, Probing single molecules and single nanoparticles by surface enhanced Raman scattering, *Science*, 275(5303), 1997.
- [11] M.V. Cañamares, D. A. Reagan, J. R. Lombardi and M. Leona, TLC-SERS of Mauve, the first synthetic dye, *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(11-12), 2014.
- [12] Irina Geiman B.S., Marco Leona Ph.D., John R. Lombardi Ph.D., Application of Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering to the analysis of synthetic dyes found in ballpoint pen inks, *Journal of Forensic Science*, 54(4), 2009.
- [13] Federica Pozzi, John R. Lombardi, Silvia Bruni, and Marco Leona, Sample treatment considerations in the analysis of organic colorants by surface-enhanced Raman scattering, *Analytical Chemistry*, 84, 2012.
- [14] M.V. Cañamares and M. Leona, Surface-enhanced Raman scattering study of the red dye laccaic acid, *Journal of Raman Spectroscopy*, 38, 2007.
- [15] M. Leona, Microanalysis of organic pigments and glazes in polychrome works of art by surface-enhanced resonance Raman scattering, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), 2009.
- [16] Ambra Idone, Monica Gulmini, Anne-Isabelle Henry, Francesca Casadio, Lauren Chang, Lorenzo Appolonia, Richard P. Van Duyne and Nilam C. Shah, Silver colloidal pastes for dye analysis of reference and historical textile fibers using direct, extractionless, non-hydrolysis surface-enhanced Raman spectroscopy, *Analyst*, 138, 2013.
- [17] Christa L. Brosseau, Kari S. Rayner, Francesca Casadio, Cecily M. Grzywacz and Richard P. Van Duyne Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A Direct Method to Identify Colorants in Various Artist Media, *Analytical Chemistry*, 81(17), 2009.
- [18] M. Leona, Jens Stenger and Elena Ferloni, Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art, *Journal of Raman Spectroscopy*, 37, 2006.
- [19] Dario P. Benedetti, Jie Zhang, Thomas J. Tague Jr, John R. Lombardi and Marco Leona, In situ microanalysis of organic colorants by inkjet colloid deposition surface-enhanced Raman scattering, *Journal of Raman Spectroscopy*, 45, 2014.
- [20] M.V. Cañamares, J. V. García-Ramos, J. D. Gómez-Varga, C. Domingo and S. Sanchez-Cortes, Ag nanoparticles prepared by laser photoreduction as substrates for in situ surface-enhanced Raman scattering analysis of dyes, *Langmuir*, 23, 2007.
- [21] Z. Jurasekova, E. del Puerto, G. Bruno, J. V. García-Ramos, S. Sanchez-Cortes and C. Domingo, Extractionless non-hydrolysis surface-enhanced Raman spectroscopic detection of historical mordant dyes on textile fibers, *Journal of Raman Spectroscopy*, 41, 2010.
- [22] Z. Jurasekova, C. Domingo, J. V. García-Ramos and S. Sanchez-Cortes, In situ detection of flavonoids in weld-dyed wool and silk textiles by surface-enhanced Raman scattering, *Journal of Raman Spectroscopy*, 39, 2008

- [23] Marco Leona, Peter Decuzzi, Thomas A. Kubic, Glenn Gates, and John R. Lombardi, *Nondestructive Identification of Natural and Synthetic Organic Colorants in Works of Art by Surface Enhanced Raman Scattering*, *Analytical Chemistry*, 83, 2011
- [24] M.V. Cañamares, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo and S. Sanchez-Cortes *Surface-enhanced Raman scattering study of the adsorption of the anthraquinone pigment alizarin on Ag nanoparticles*, *Journal of Raman Spectroscopy*, 35, 2004
- [25] M.V. Cañamares, J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Surface-enhanced Raman scattering study of the anthraquinone red pigment carminic acid*, *Vibrational Spectroscopy*, 40, 2006
- [26] R.M. Christie, *Colour chemistry*, RSC Paperbacks, London, 2001
- [27] I. Mansoor, *Textile dyes*, Rehbar Publishers Karachi, 2008
- [28] K.Hunger (ed), *Industrial dyes – chemistry, properties, applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003
- [29] S. Grishanov, *Structure and properties of textile materials*, in M. Clark (ed.), *Handbook of textile and industrial dyeing*, vol.1: Principles, processes and types of dyes, Woodhead Publishing, 2011
- [30] Jeffrey S. Church, Gary L. Corino and Andrea L. Woodhead, *The Analysis of Merino Wool Cuticle and Cortical Cells by Fourier Transform Raman Spectroscopy*, *Biopolymers*, 42 (1), 1997
- [31] J.A.A. Crossley, C.T. Gibson, L.D. Mapledoram, M.G. Huson, S. Myhra, D.K. Pham, C.J. Sofield, P.S. Turner, G.S. Watson, *Atomic force microscopy analysis of wool fibre surfaces in air and under water*, *Micron*, 31, 2000
- [32] D.M. Lewis, *The colouration of wool*, in M. Clark (ed.), *Handbook of textile and industrial dyeing*, vol.2: Applications of dyes, Woodhead publishing, 2011
- [33] D.P. Chattopadhyay, *Chemistry of dyeing*, in M. Clark (ed.), *Handbook of textile and industrial dyeing*, vol.1: Principles, processes and types of dyes, Woodhead Publishing, 2011
- [34] Society of dyers and colourists, *Colour Index*, fourth web edition, www.colourindex.org
- [35] Zuzana Jurasekova, *Espectroscopias ópticas sobre superficies metálicas nanoestructuradas aplicadas al estudio de flavonoides: pigmentos amarillos de interés en el patrimonio histórico cultural*, Tesis doctoral UNED, Madrid 2009.
- [36] Francesca Gallazzi, *MSc Tesis de química analítica organica de los materiales, Developement, optimization and comparison of enhanced vibrational techniques for the analysis of colorants*, Bolonia 2014.
- [37] José Vicente García Ramos CSIC, *¿Qué sabemos de? las moléculas: cuando la luz te ayuda a vibrar.*, ed. Catarata 2014
- [38] Adianez García Leis, *Fabricación de nanoestructuras con propiedades plasmónicas: Aplicaciones en espectroscopía Raman intensificada por superficie para la caracterización de colorantes marcadores de Alzheimer*, Trabajo fin de máster Madrid 2012.
- [39] M.V. Cañamares, J.V. García Ramos, J.D. Gomez-Varga, C.Domingo, S. Sanchez-Cortes, *S. Langmuir* 2007, 23, 5210-5215.
- [40] M.V. Cañamares, *Espectroscopía Raman sobre superficies metálicas nanoestructuradas (SERS) aplicada al estudio de pigmentos del Patrimonio Histórico Artístico*. Tesis doctoral, Univerdiada complutense de Madrid, Madrid, 2006
- [41] Kui Chen, Marco Leona, Kim-Chi Vo-Dinh, Fei Yan, Musundi B. Wabuyele and Tuan Vo-Dinh, *Application of surface-enhanced Raman scattering (SERS) for the identification of anthraquinone dyes used in works of art*, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006; 37: 520–527
- [42] E.V. Akatova, González Grau, Juan Miguel, Sáiz-Jiménez, Cesáreo, *Analysis of the microbial communities from a restored tomb in the necropolis of carmona*, Coalition, CSIC Thematic Network on Cultural Heritage. Electronic Newsletter, 7, 14-21, 2007
- [43] Smith, G. D. y R. J. H. Clark, *Raman microscopy in art history and conservation science*, *Reviews in Conservation* 2: 92-106, 2001
- [44] Smith, G. D. y R. J. H. Clark, *Raman microscopy in archaeological science*, *Journal of Archaeological Sciences* 31: 1137-1160, 2004
- [45] Gang Chen, Yong Wang, Miaoxin Yang, Jun Xu, Sook Jin Goh, Ming Pan, and Hongyu Chen, *Measuring Ensemble-Averaged Surface-Enhanced Raman Scattering in the Hotspots of Colloidal Nanoparticle Dimers and Trimers*, *JACS communications*, 2009.
- [46] Luca Guerrini, Irene Izquierdo-Lorenzo, José V. Garcia-Ramos, Concepción Domingo and Santiago Sanchez-Cortes, *Self-assembly of α,α -aliphatic diamines on Ag nanoparticles as an effective localized surface plasmon nanosensor based in interparticle hot spot*, *PCCP Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009.
- [47] Weiyang Li, Pedro H. C. Camargo, Xianmao Lu, and Younan Xia, *Dimers of Silver Nanospheres: Facile Synthesis and Their Use as Hot Spots for Surface-Enhanced Raman Scattering*, *Nano letters* Vol. 9, No. 1, 485-490, 2008.
- [48] Irene Izquierdo-Lorenzo, Jana Kubackova, Delphine Manchon, Alexis Mosset, Emmanuel Jean Cottancin, and Santiago Sanchez-Cortes, *Linking Ag Nanoparticles by Aliphatic Dithiols: A Study of the Aggregation and Formation of Interparticle Hot Spots*, *The Journal of Physical Chemistry*, 2013.