



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

**“IMPLEMENTACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE
CONTAMINANTES EMPLEANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN
INTENSIFICADA POR FENÓMENOS DE SUPERFICIE Y DE
RESONANCIA”**

Tesista: María Luz Rizzato

Directora: Rosana M. Romano

Directora: Andrea Lorena Picone

Año: 2022

INDICE

RESUMEN	1
1.1. Introducción	4
1.2. Referencias.....	8
2.1. Espectroscopia Raman Intensificada por fenómenos de Superficie (SERS)	9
2.2. Contexto histórico.....	12
2.3. Origen de la intensificación SERS.....	13
2.3.1. Mecanismo Electromagnético (EM)	15
2.3.1.1. Naturaleza del metal.....	17
2.3.1.2. Modelo de la esfera metálica: Tamaño de nanopartículas	19
2.3.1.3. Efectos de proximidad	21
2.3.1.4. Factor forma: Agregados y fractales.....	22
2.3.1.5. El rol de los puntos calientes (<i>Hot Spots</i>)	22
2.3.1.6. Reglas de selección: Orientación superficial	24
2.3.2. Mecanismo químico o de transferencia de carga (CT).....	26
2.3.2.1. SERS de moléculas quimisorbidas sin resonancia de CT.....	29
2.3.2.2. SERS de moléculas quimisorbidas con resonancia de CT	29
2.4. Fluorescencia del analito o contaminantes	31
2.5. Sustratos para espectroscopia SERS	31
2.5.1. Sustratos para la detección directa	32
2.5.1.1. Agregados de nanopartículas en solución	33
2.5.1.2. Nanopartículas ensambladas a una superficie	34
2.5.1.3. Nanopartículas ordenadas en matrices (estructurados)	36
2.5.2. Sustratos para la detección indirecta	37
2.5.3. Sustratos comerciales.....	39
2.5.4. Caracterización de los sustratos.....	39
2.6. Aplicaciones de la espectroscopia SERS	40
2.7. Referencias.....	43
3.1. Agroquímicos	50

3.2.	Clasificación	52
3.2.1.	Tiram.....	54
3.2.2.	Tiabendazol.....	55
3.2.3.	Carbendazim.....	56
3.3.	Problemas derivados del uso inadecuado de agroquímicos	57
3.4.	Regulación en el uso de agroquímicos	58
3.5.	Metodologías para la detección de residuos de agroquímicos en alimentos .	62
3.6.	Referencias.....	63
4.1.	Materiales Equipos.....	67
4.2.	Reactivos y materiales de laboratorio.....	67
4.3	Técnicas instrumentales.....	68
4.3.1.	Espectroscopia UV-Visible (UV-Vis).....	69
4.3.2.	Microscopía Electrónica.....	71
4.3.3.	Espectroscopia Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	72
4.3.4.	Espectroscopia Raman.....	73
4.3.5.	Espectroscopia SERS.....	74
4.3.	Referencias.....	77
5.1.	Fabricación de sustratos SERS.....	79
5.2.	Síntesis de nanopartículas de plata.....	79
5.2.1.	Nanopartículas de plata “esféricas” (AgNPs).....	79
5.2.2.	Nanoestrellas de plata (AgNSs).....	83
5.3.	Preparación de sustratos SERS flexibles.....	88
5.3.1.	Gel de agar (<i>Sustrato 1</i>).....	88
5.3.2.	Papel de filtro (<i>Sustrato 2</i>).....	90
5.4.	Referencias.....	94
6.1.	Evaluación de la eficiencia SERS con azul de metileno	96
6.2.	Introducción.....	97
6.3.	Preparación de muestras	97
6.4.	Resultados y discusión	98
6.4.1.	Espectroscopia UV-Vis	98
6.4.2.	Espectroscopia FTIR.....	100

6.4.3.	Espectroscopia Raman y SERRS.....	101
6.5.	Conclusiones.....	112
6.6.	Referencias.....	114
7.1.	Tiram	117
7.2.	Introducción.....	117
7.3.	Preparación de muestras.....	118
7.4.	Resultados y discusión.....	120
7.4.1.	Espectroscopia UV-Vis y FTIR.....	120
7.4.2.	Espectroscopia SERS.....	124
7.4.3.	Características espectrales del tiram.....	128
7.4.4.	Detección de residuos de tiram en cáscaras de frutas y vegetales.....	134
7.5.	Conclusiones.....	146
7.6.	Referencias.....	150
8.1.	Compuestos benzimidazólicos	152
8.2.	Introducción.....	152
8.3.	Preparación de muestras.....	153
8.4.	Resultados y discusión.....	154
8.4.1.	Espectroscopias UV-Vis y FTIR.....	154
8.4.1.1.	Tiabendazol.....	154
8.4.1.2.	Carbendazim.....	158
8.4.2.	Evaluación de los sustratos SERS frente a compuestos benzimidazólico....	
	159
8.4.2.1.	Tiabendazol.....	159
8.4.2.2.	Carbendazim.....	172
8.4.3.	Características espectrales del TBZ.....	174
8.4.4.	Detección de residuos de plaguicidas en cáscaras de frutas y vegetales....	
	180
8.5.	Conclusiones.....	190
8.6.	Referencias.....	192
9.1.	Conclusiones generales.....	195

RESUMEN

La espectroscopia Raman intensificada por fenómenos de superficies (SERS) es una técnica que ha demostrado ser una herramienta ultrasensible para la detección de contaminantes en alimentos. En este contexto, la presente Tesis aborda el estudio y detección de residuos de plaguicidas presentes en las cáscaras de frutas y vegetales mediante la espectroscopia SERS. Para ello, en una primera etapa se sintetizaron nanopartículas de plata de diferentes morfologías, que fueron caracterizadas mediante espectroscopia UV-Vis y microscopía electrónica (STEM y SEM). Además, las dispersiones de NPs sintetizadas fueron evaluadas para determinar su estabilidad en el tiempo mediante su seguimiento por espectroscopia UV-Vis. Posteriormente, las nanopartículas sintetizadas se emplearon para la fabricación de sustratos SERS flexibles; utilizando como soporte principalmente gel de agar y papel de filtro. Las plataformas fueron caracterizadas por UV-Vis DRS y evaluadas para determinar su capacidad SERS y su homogeneidad mediante el empleo de moléculas de prueba, como azul de metileno, alcanzando a detectar una concentración superficial $\sim 3 \text{ pg/cm}^2$, equivalente a 60 moléculas/spot. Por último, se emplearon los sustratos SERS flexibles para investigar la posibilidad de detección de residuos de plaguicidas (tiram, tiabendazol y carbendazim) en cáscaras de diferentes frutas y vegetales. Para este fin, se contaminaron intencionalmente cáscaras de distintas frutas y vegetales (manzana, pera, frutilla, tomate, morrón verde, berenjena, cereza) y luego se emplearon los sustratos SERS flexibles desarrollados para extraer *in situ* los plaguicidas de las superficies. A partir de los sustratos empleados para la microextracción se colectaron espectros y mapas SERS de los fungicidas. Mediante un análisis exhaustivo de los espectros SERS en comparación con las sustancias sólidas fue posible proponer los mecanismos de adsorción de los diferentes analitos sobre la superficie de las nanopartículas. Adicionalmente, para uno de los sustratos (AgNPs en gel de agar) se evaluó la capacidad de recuperación del analito mediante el proceso de microextracción con el sustrato de gel de agar, para ello se llevaron a cabo microextracciones sucesivas sobre la misma cáscara de fruta. De manera conjunta para este sustrato se exploraron y analizaron otros factores como son, el cambio en las

señales SERS según el grado de deshidratación, la durabilidad en el tiempo del sustrato (sin sembrar), y capacidad para encapsular al analito y su capacidad para conservarlo junto con su respuesta SERS a lo largo del tiempo. Se determinó el límite de detección de los plaguicidas empleando el sustrato de gel de agar para cada una de las frutas obteniéndose por ejemplo para la cáscara de manzana con uno de los sustratos desarrollados $2,0 \text{ pg/cm}^2$ para tiram y $0,20 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ para tiabendazol, encontrándose por debajo de los límites máximos de residuos establecidos por diferentes entes reguladores. Los resultados obtenidos durante la presente Tesis doctoral demuestran que los sustratos SERS flexibles desarrollados son útiles para la extracción y detección *in situ* de plaguicidas sobre cáscaras de frutas y vegetales.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

En los últimos años, la seguridad alimentaria ha despertado un gran interés en la sociedad debido, entre otros aspectos, a la presencia de contaminantes en los alimentos. La creciente demanda de alimentos derivada del incremento poblacional provocó una expansión de la actividad agrícola y con ella el incremento del uso de productos químicos para proteger a los cultivos frente a plagas. Los plaguicidas son sustancias químicas destinadas a eliminar o repeler plagas indeseadas en plantas y animales, con efectos muchas veces acumulativos y poco selectivos. Si bien el empleo de plaguicidas muchas veces presenta beneficios, como por ejemplo para el control de enfermedades transmitidas por vectores, su uso también puede ocasionar consecuencias indeseadas debido al empleo excesivo o inadecuado, lo que representa un riesgo tanto para la salud humana así como también para el medio ambiente. La determinación de residuos de plaguicidas tiene un rol importante en la prevención de la salud, ya que nos encontramos continuamente expuestos a diversos agroquímicos, y una de las fuentes principales de estos compuestos es debida a la ingesta diaria de alimentos contaminados. La exposición repetida a largo plazo de uno o varios plaguicidas puede conducir a efectos tóxicos crónicos, lo que resulta perjudicial para la salud [1]. En este contexto, resulta fundamental el desarrollo de nuevas técnicas que mejoren la determinación *cuali* y *cuantitativa* de estas sustancias contaminantes presentes en los alimentos, con límites de detección más bajos y tratamientos de preparación de muestras menos laboriosos. Actualmente, técnicas basadas en cromatografía (LC-GCMS y HPLC) son empleadas para la detección y cuantificación de residuos de plaguicidas en los alimentos ya que presenta gran reproducibilidad y sensibilidad [2,3,4,5]. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la espectroscopia SERS (del inglés, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) es una metodología muy promisoría para este tipo de determinaciones, ya que presenta ventajas frente a las técnicas tradicionalmente utilizadas como la cromatografía. Dentro de las ventajas de SERS frente a las técnicas más convencionales son: rapidez en las determinaciones, sin tratamientos previos de muestras antes de ser analizadas; la posibilidad de realizar mediciones *in situ*, siendo una técnica no destructiva,

ultrasensible y en muchos casos portable. En 1987 fue reportado por primera vez el empleo de la técnica de espectroscopia SERS para la detección y estudio de un plaguicida [6]. A partir de este primer trabajo han sido publicados numerosos estudios sobre la detección de residuos de plaguicidas en distintos tipos de matrices alimentarias con el empleo de distintos sustratos o plataformas SERS [7,8].

La espectroscopia SERS, a diferencia de la espectroscopia Raman, se caracteriza por las enormes intensificaciones de las señales debido a la presencia de un sustrato metálico nanoestructurado. La espectroscopia SERS involucra tanto el estudio de nanomateriales como el empleo de espectroscopia Raman, por lo que puede considerarse como una técnica interdisciplinaria [9]. Si bien existen controversias con respecto al mecanismo responsable de las grandes intensificaciones, hoy en día se acepta que en la espectroscopia SERS actúan dos mecanismos fundamentales: el Mecanismo Electromagnético (EM) y el Mecanismo Químico o de Transferencia de Cargas (CT), pudiendo actuar de manera conjunta o por separado dependiendo de cada sistema. El EM surge como consecuencia de las propiedades plasmónicas del sustrato metálico y es considerada la contribución más importante al efecto SERS, logrando intensificaciones de hasta 10^8 – 10^{10} , dependiendo de la naturaleza y características morfológicas del sustrato [10,11]. Por otro lado, el mecanismo de CT implica cambios en los estados electrónicos del sistema metal-molécula suponiendo la formación de un complejo superficial. En este caso, la intensificación es atribuida a la polarizabilidad molecular, alcanzando intensificaciones del orden de 10^2 – 10^4 . Este mecanismo no es considerado universal en espectroscopia SERS, como en el caso del EM, ya que depende de la naturaleza del sistema metal-adsorbato [12].

A lo largo de los años desde el descubrimiento de la espectroscopia SERS, se han reportado numerosos tipos de sustratos SERS activos y se han clasificado de acuerdo con sus propiedades (naturaleza de metal, recubrimiento de nanopartículas, sustratos rígidos o flexibles, sustratos para la detección directa e indirecta, entre otras). Si bien la elección del sustrato está principalmente determinada por su uso y aplicación, es deseable que presenten: buena intensificación de las señales, uniformidad, reproducibilidad, estabilidad en el tiempo, bajos costos y facilidad en su elaboración [11,13]. Los sustratos rígidos han sido ampliamente reportados ya que

presentan generalmente la facilidad de controlar las nanoestructuras metálicas que dan lugar en la mayoría de los casos a sustratos con buena intensificación de la señal y reproducibles. Sin embargo, este tipo de sustrato SERS no pueden ser empleados para el análisis *in situ* sobre superficies rugosas, requiriendo en general tratamientos previos de las muestras. Recientemente, el desarrollo de sustratos SERS flexibles se ha incrementado notablemente, ya que presentan la ventaja de poder explorar diferentes superficies no planas de modo *in situ*, como por ejemplo las superficies de los alimentos, logrando grandes intensificación, control y reproducibilidad de las plataformas SERS [14,15,16,17].

La espectroscopia SERS es una técnica promisoría para la detección de trazas de residuos de agroquímicos presentes en los alimentos, frutas y verduras, ya que es un método rápido, no destructivo y presenta la posibilidad de realizar medidas *in situ* con el empleo de sustratos flexibles. En base a lo mencionado, se ha propuesto como uno de los objetivos principales del presente trabajo de Tesis Doctoral desarrollar y caracterizar nuevos sustratos SERS flexibles para ser empleadas en la detección y estudio de agroquímicos.

Los agroquímicos pueden clasificarse de diferentes formas, entre ellas la clasificación más empleada es la que está determinada por el organismo blanco, como por ejemplo los fungicidas, herbicidas, insecticidas, entre otras. También, estos pueden clasificarse según su principio activo o estructura química. En este contexto, se han seleccionado tres fungicidas para este trabajo en base a lo mencionado previamente; tiram, tiabendazol y carbendazim (**Figura 1.1.**). Estos fungicidas son muy empleados para el tratamiento y control de enfermedades causadas por hongos y en muchos casos se utilizan para el transporte y almacenamiento de productos agrarios.

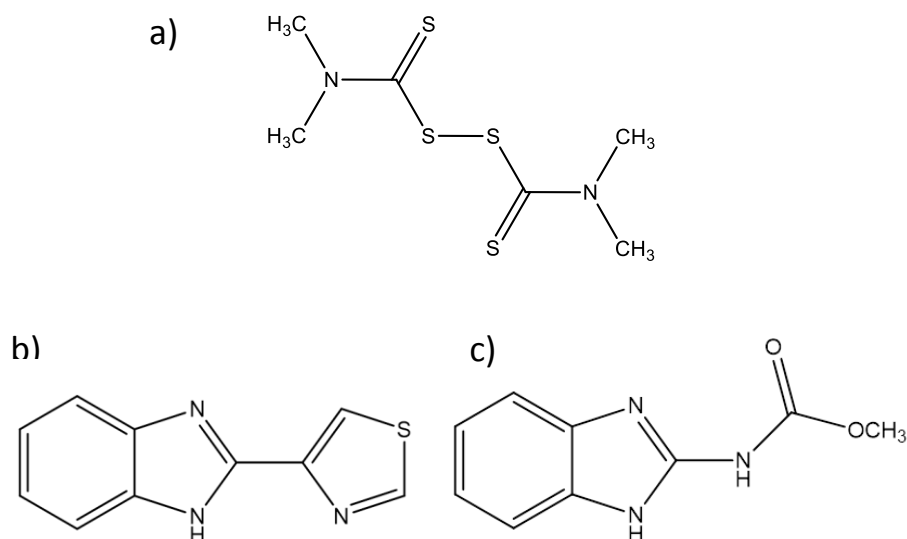


Figura 1.1.: Estructura química de los fungicidas seleccionados para el estudio en cáscaras de frutas y vegetales mediante espectroscopia SERS. a) Tiram; b) Tiabendazol y c) Carbendazim.

Como se mencionó, el objetivo principal de este trabajo de Tesis es el desarrollo de sustratos SERS para la detección ultrasensible de contaminantes. Para ello, se desarrollaron y caracterizaron diferentes sustratos SERS flexibles; los mismos fueron evaluados con una molécula de prueba (azul de metileno) para determinar su eficiencia SERS. Previo a los estudios SERS los plaguicidas se caracterizaron por espectroscopia FTIR. Se analizaron además los espectros electrónicos UV-visibles, evaluando la posibilidad de realizar medidas en condiciones de resonancia o prerresonancia Raman con los láseres visibles disponibles en el laboratorio. Con el fin de encontrar las condiciones más eficientes para las medidas SERS, se tomaron los espectros de los sustratos SERS conteniendo los contaminantes con diferentes longitudes de onda de excitación. Adicionalmente, se estimaron las posibles interacciones entre el contaminante y la superficie metálica de las nanopartículas que conforman las plataformas SERS mediante el estudio de los espectros Raman de los analitos en ausencia del metal con los espectros SERS obtenidos. Finalmente, se evaluó la detección de estos contaminantes sobre la superficie de las cáscaras de frutas y vegetales mediante el empleo de los sustratos SERS flexibles desarrollados y se determinó los límites de detección de los fungicidas extraídos de las superficies de cáscaras de frutas y vegetales mediante el empleo de los sustratos SERS.

1.2. Referencias

- [1] <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>.
- [2] F. Hernández, J. V. Sancho y O. J. Pozo, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, *382*, 934.
- [3] J. S. Aulakh, A. K. Malik, V. Kaur y P. Schmitt-Kopplin, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2005**, *35*, 71.
- [4] J. Sherma, *J. Environ. Sci. Health B*, **2013**, *48*, 417.
- [5] J. Sherma, *J. Environ. Sci. Health B*, **2015**, *50*, 301.
- [6] A. M. Alak y T. Vo-Dinh, *Anal. Chem.*, **1997**, *59*, 2149.
- [7] S. Pang, T. Yang y L. He, *Trends Analyt. Chem.*, **2016**, *85*, 73.
- [8] M. Xu, Y. Gao, X. X. Han y B. Zhao, *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, *65* (32), 6719-6726.
- [9] S. Schlücker, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 4756.
- [10] E. C. Le Ru y P. G. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*, Elsevier, **2008**.
- [11] P. G. Etchegoin y E. C. Le Ru, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Ed.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, pp. 1 – 37.
- [12] D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *403*, 27.
- [13] Pilot, R.; Signorini, R.; Durante, C.; Orian, L.; Bhamidipati, M.; y Fabris, L. *Biosensors*. **2019**, *9*, 57.
- [14] Zhang, D.; Pu, H.; Huang, L. y Sun, D. W. *Trends Food Sci Technol*. **2021**, *109*, 690–701.
- [15] Xu, M-L.; Gao, Y. y Han, X-X. *Foods*. **2022**, *11*, 2097, 1–12.
- [16] Liu, C.; Xu, D.; Dong, X.; Huang, Q. *Trends Food Sci Technol* .**2022**, *128*, 90–101.
- [17] Nilghaz, A.; Mousavi, S. M.; Amiri, A.; Tian, J.; Cao, R. y Wang, X. *J. Agric. Food Chem*. **2022**, *70*, 5463–5476.

CAPÍTULO 2

ESPECTROSCOPIA SERS

La espectroscopia SERS (del inglés, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) se caracteriza por la extraordinaria intensificación que experimentan algunos modos de vibración de determinadas moléculas cuando se encuentran en las proximidades de ciertas superficies metálicas nanoestructuradas.



Figura 2.1. C.V. Raman

El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico Chandrasekhara Venkata Raman (**Figura 2.1.**) en el año 1921. En 1930, le otorgaron el premio Nobel de Física por su trabajo sobre la dispersión de la luz y por el descubrimiento del efecto que lleva su nombre.

El efecto Raman se basa en la dispersión inelástica de la luz por la materia. Cuando una radiación electromagnética monocromática, con energía $h \cdot \nu_0$ (donde h es la constante de Planck), incide sobre una molécula, esta se excita hasta un estado virtual no estacionario para decaer, posteriormente, emitiendo un fotón denominado fotón Raman o inelástico ($h \cdot \nu_i$). Este fotón puede presentar una energía menor o mayor que el fotón incidente, dependiendo del nivel vibracional en el que inicialmente se encuentre la molécula, dando lugar a la aparición de las líneas Stokes y Anti-Stokes, respectivamente [1,2,3]. Ambas series se disponen de manera simétrica con respecto a la línea Rayleigh, que corresponde a la dispersión elástica de la luz, es decir, los fotones dispersados tienen la misma frecuencia que el fotón incidente (ν_0) (**Figura 2.2.**).

Cuando la luz es dispersada por una molécula, la mayoría de los fotones son dispersados elásticamente (dispersión Rayleigh). Sin embargo, una pequeña fracción de la luz (aproximadamente 1 en 10^7 fotones) es dispersada a frecuencias diferentes a la luz incidente (dispersión Raman).

Debido a que la población de los niveles vibracionales obedece la ley de distribución de Boltzmann, la intensidad de las bandas Raman Stokes será mayor que para el caso de las bandas anti-Stokes. Por esta razón, usualmente en los espectros Raman se presentan solo las bandas Stokes [4].

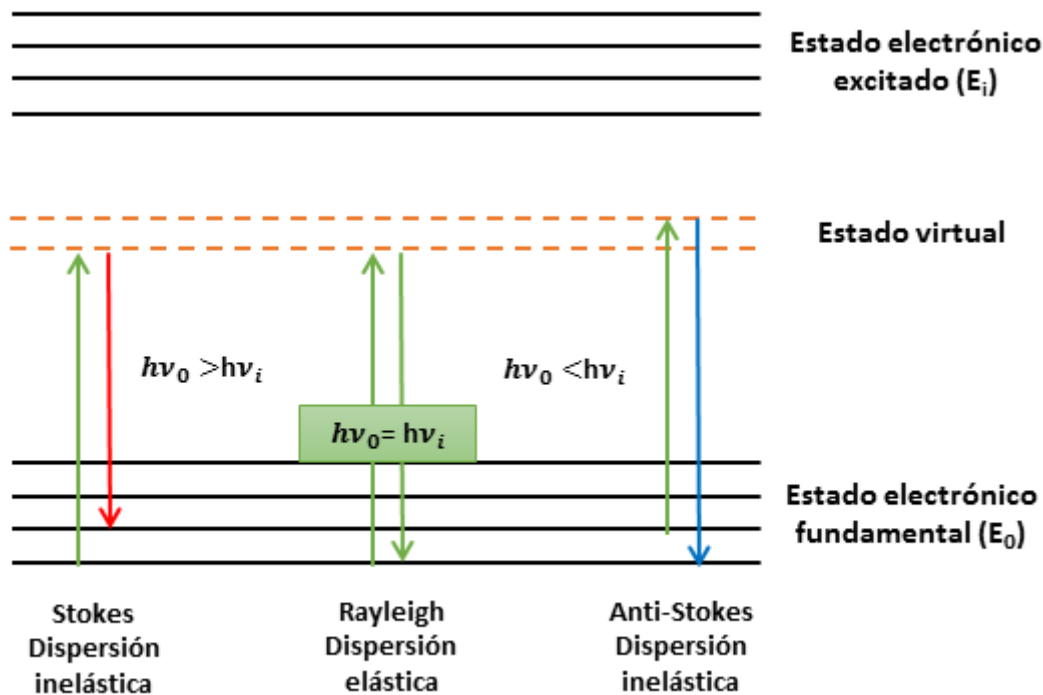


Figura 2.2. Diagrama energético donde se esquematizan las distintas formas de dispersión de la radiación electromagnética.

La espectroscopia Raman proporciona información molecular altamente específica y permite la determinación de mezclas formadas por varios componentes. Sin embargo, esta técnica presenta el inconveniente de la baja intensidad de su señal; como se mencionó anteriormente solo una pequeña fracción de la luz es dispersada inelásticamente. En este sentido, el descubrimiento de la espectroscopia Raman intensificada por fenómenos de superficies ha constituido un gran avance debido a su alta sensibilidad, convirtiéndose en una herramienta poderosa en diferentes áreas de estudios.

La espectroscopia SERS combina las ventajas intrínsecas de la espectroscopia Raman ((a) capacidad de identificación, debido a vibraciones características de las moléculas; (b) análisis no destructivo; (c) requerimientos mínimos de preparación de las muestras; (d) posibilidad de realizar mediciones en fluidos biológicos, ya que el espectro Raman del agua es bastante débil; (e) detección simultánea de mezclas de varios componentes; (f) posibilidad de realizar análisis *in situ* con instrumentos portátiles)[1,5] con la alta sensibilidad de la espectroscopia SERS que, en algunos

casos, incluso puede permitir la detección de una sola molécula individual, proceso conocido como “*Single Molecule Detection*” (SMD)[2,6,7].

2.2.Contexto histórico

La dispersión Raman intensificada por fenómenos de superficie fue observada por primera vez en 1974 por Fleischmann y col. [8], quienes reportaron una señal Raman inesperadamente grande de piridina adsorbida en un electrodo de plata rugoso sometido a varios ciclos de oxidación-reducción. Al poco tiempo, Jeanmaire y van Duyne [9] y Albrecht y Creighton [10], en investigaciones independientes, confirmaron los hallazgos de Fleischmann, y plantearon que este fenómeno se originaba por fuertes campos eléctricos en la superficie del metal o al incremento del número de moléculas presentes en la superficie [9,10]. En años posteriores, Moskovits [11,12] propuso que el incremento de la señal Raman se originaba por la excitación de las oscilaciones colectivas de los electrones en las superficies metálicas nanométricas, alcanzando una intensificación total promedio de ~ 10 órdenes de magnitud. Así concluyeron que cuando una molécula se encontraba en presencia de un metal, con irregularidades superficiales nanométricas de dimensiones comparables a la longitud de onda de excitación del láser, se conseguía registrar espectros Raman a muy bajas concentraciones.

La combinación de la alta sensibilidad con su selectividad superficial convierte a la técnica SERS en una herramienta espectroscópica vibracional muy eficiente que permite la detección estructural de sustancias a muy bajas concentraciones, incluso trazas [2,3,6,7].

Las características intrínsecas de la espectroscopia SERS, junto con los avances instrumentales, han permitido la aplicación de esta herramienta en muchas áreas, considerándose una técnica interdisciplinaria ya que involucra a disciplinas como física, química, tecnología, ciencia de los materiales y biología [4]. El creciente interés por la espectroscopia SERS se ve reflejado en el aumento, a lo largo de los últimos años, en el número de publicaciones por año asociadas a esta técnica (**Figura 2.3.**).

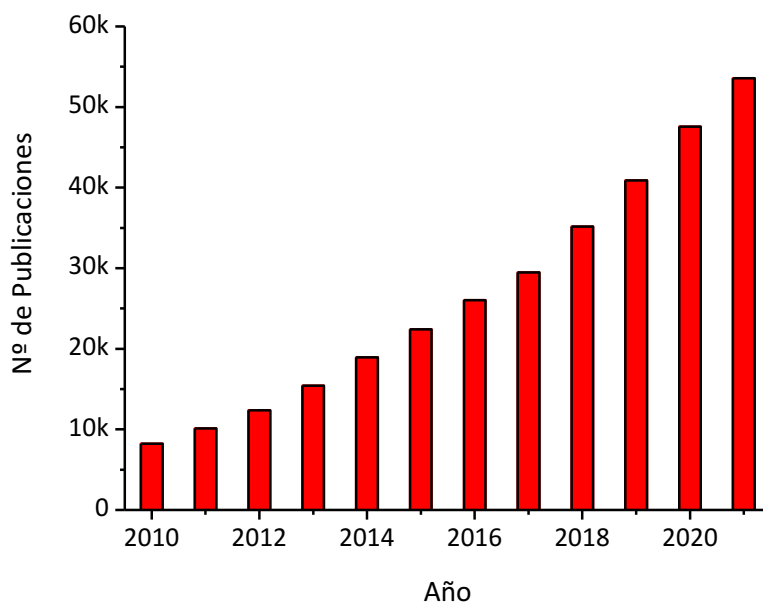


Figura 2.3. Publicaciones de espectroscopia Raman intensificada por fenómenos de superficie entre los años 2010 y 2021. Fuente: **Dimensions** (<https://dimensions.ai/>).

En la actualidad, el fenómeno causante de la gran intensificación de las señales Raman, efecto SERS, es objeto de discusión. Se acepta la existencia de dos contribuciones principales al fenómeno SERS: el mecanismo de intensificación electromagnético (EM, del inglés *electromagnetic mechanism*) y el mecanismo químico o de transferencia de carga (CT, del inglés *charge transfer mechanism*).

2.3. Origen de la intensificación SERS

Como se ha mencionado anteriormente, la dispersión Raman generada por moléculas ubicadas en las proximidades de una superficie metálica nanoestructurada puede ser fuertemente incrementada por el fenómeno SERS. La relación de las intensidades de dispersión Raman y SERS puede representarse mediante la siguiente ecuación [4]:

$$P_{SERS} = P_{Raman} \cdot G_{SERS} \quad (2.1.)$$

$$P_{SERS} = P_{Raman} \cdot G_{SERS}^{TC} \cdot G_{SERS}^{EM} \quad (2.2.)$$

donde P_{Raman} y P_{SERS} son las intensidades de la luz dispersada medidas por el detector (Raman y SERS, respectivamente). El factor G_{SERS} representa la intensificación total inducida por el sustrato, la cual está compuesta por dos contribuciones, la debida al mecanismo de intensificación electromagnético (EM) y la originada en el mecanismo químico o de transferencia de carga (CT).

Los mecanismos se fundamentan en principios totalmente distintos, pero pueden actuar de manera conjunta o de forma separada, dependiendo de las condiciones experimentales. La contribución de cada uno de ellos a la intensificación total aún no ha sido resuelta satisfactoriamente. En la **Tabla 2.1.** se pueden observar las principales características de cada una de las contribuciones de manera comparativa.

Tabla 2.1. Comparación de las principales características de los mecanismos de intensificación: electromagnético (EM) y químico o de transferencia de carga (CT).

	Mecanismo EM	Mecanismo CT
Contribución efecto SERS (valor aproximado)	10^{8-10} dependiendo de la naturaleza y morfología del sustrato [13].	10^{2-4} dependiendo del mecanismo involucrado.
Origen	Intensificación del campo eléctrico debido a plasmones superficiales del metal. Independiente del tipo de molécula.	Modificación de la polarizabilidad de la molécula como consecuencia de la interacción físico-química con el sustrato. Dependiente del tipo de molécula.
Dependencia con la distancia	Considerado efecto de largo alcance comparado con las distancias de enlaces químicos (hasta ~10 nm de distancia de la superficie metálica).	Es requerido el contacto a corto alcance entre la molécula y el sustrato [1,13].

El efecto SERS depende de una gran cantidad de parámetros, incluyendo:

- Características del láser de excitación empleado (longitud de onda, polarización, etc.).
- Sustrato/plataformas SERS, en particular: material, geometría, orientación con respecto a la dirección y polarización del haz incidente.
- Propiedades intrínsecas del analito como la polarizabilidad Raman.
- Propiedades de adsorción del analito: eficiencia de adsorción del analito, su concentración, distancia y orientación a la superficie, y posible modificación de polarizabilidad inducidas por la adsorción.

Estos aspectos serán discutidos con mayor detalle en las siguientes secciones.

2.3.1. Mecanismo Electromagnético (EM)

El mecanismo electromagnético (EM), considera el incremento de la radiación incidente (E_0) debido a la presencia de plasmones superficiales (LSP, del inglés *Localized Surface Plasmons*), concentrándola en su superficie, por lo que una molécula en sus proximidades está sometida a una radiación mucho más intensa que en ausencia del metal. Si cuando incide el fotón sobre la nanoestructura metálica lo hace en condiciones de resonancia con las frecuencias de los LSP, entonces tiene lugar la excitación de estos, dado lugar al fenómeno denominado como resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR del inglés, *Localized Surface Plasmon Resonance*). La intensificación electromagnética debida a la presencia de una superficie metálica nanoestructurada puede explicarse a través de dos contribuciones. Por un lado, si una molécula se encuentra situada en la posición r' respecto a la superficie de una partícula metálica, cuando incide un haz de luz el cual tiene asociado un campo eléctrico (E_0) con frecuencia (ν_0), induce en la molécula un momento dipolar (μ_m) emitiendo radiación Raman de frecuencia (ν_R) que puede ser expresado en función de la polarizabilidad (α), de la siguiente forma:

$$\mu_m(r', \nu_R) = \alpha \cdot E_{total\ incidente}(r', \nu_0) \quad (2.3.)$$

donde el campo eléctrico de la luz que incide en la molécula, $E_{total\ incidente}(r', \nu_0)$, está compuesto no solo por el campo externo del láser incidente (E_0) a frecuencia (ν_0), sino también por el campo eléctrico de la luz dispersada por el propio metal (E_{LM}) a la misma frecuencia (ν_0), que puede ser calculado mediante la teoría de Lorenz-Mie **(Figura 2.4.)**. Como consecuencia, el campo eléctrico total que experimenta la molécula es:

$$E_{total\ incidente} = E_0(r', \nu_0) + E_{LM}(r', \nu_0) \quad (2.4.)$$

Por otro lado, el campo eléctrico asociado con la radiación dispersada Raman, de frecuencia (ν_R), es una contribución de la radiación emitida directamente por la molécula $E_R(r, \nu_R)$, es decir, en ausencia del metal, y la dispersada por las partículas metálicas de su entorno $E_{SC}(r, \nu_R)$. Por lo tanto, el campo eléctrico total de la luz dispersada que llega al detector en la posición r , y frecuencia (ν_R) [4] está dado por:

$$E_{SERS}(r, \nu_R) = E_R(r, \nu_R) + E_{SC}(r, \nu_R) \quad (2.5.)$$

Como se mencionó anteriormente, si la frecuencia de la radiación incidente se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los LSP, el campo electromagnético dispersado por las partículas metálicas resulta mucho más intenso [1,4,12,14].

La intensidad del campo eléctrico dispersado (I_R) puede calcularse a partir del campo eléctrico total dispersado, (E_R) de frecuencia (ν_R). Si I_r^0 es el valor de esta intensidad en ausencia del metal, puede entonces definirse nuevamente el factor de intensificación G_{SERS} de la siguiente forma [12]:

$$G_{SERS} = I_R/I_r^0 \quad (2.6.)$$

El efecto de intensificación EM dependen de varios factores incluyendo naturaleza, tamaño y agregado de las nanopartículas (NPs) que conforman el sustrato SERS. Estas variables se discutirán con más detalle en las siguientes secciones.

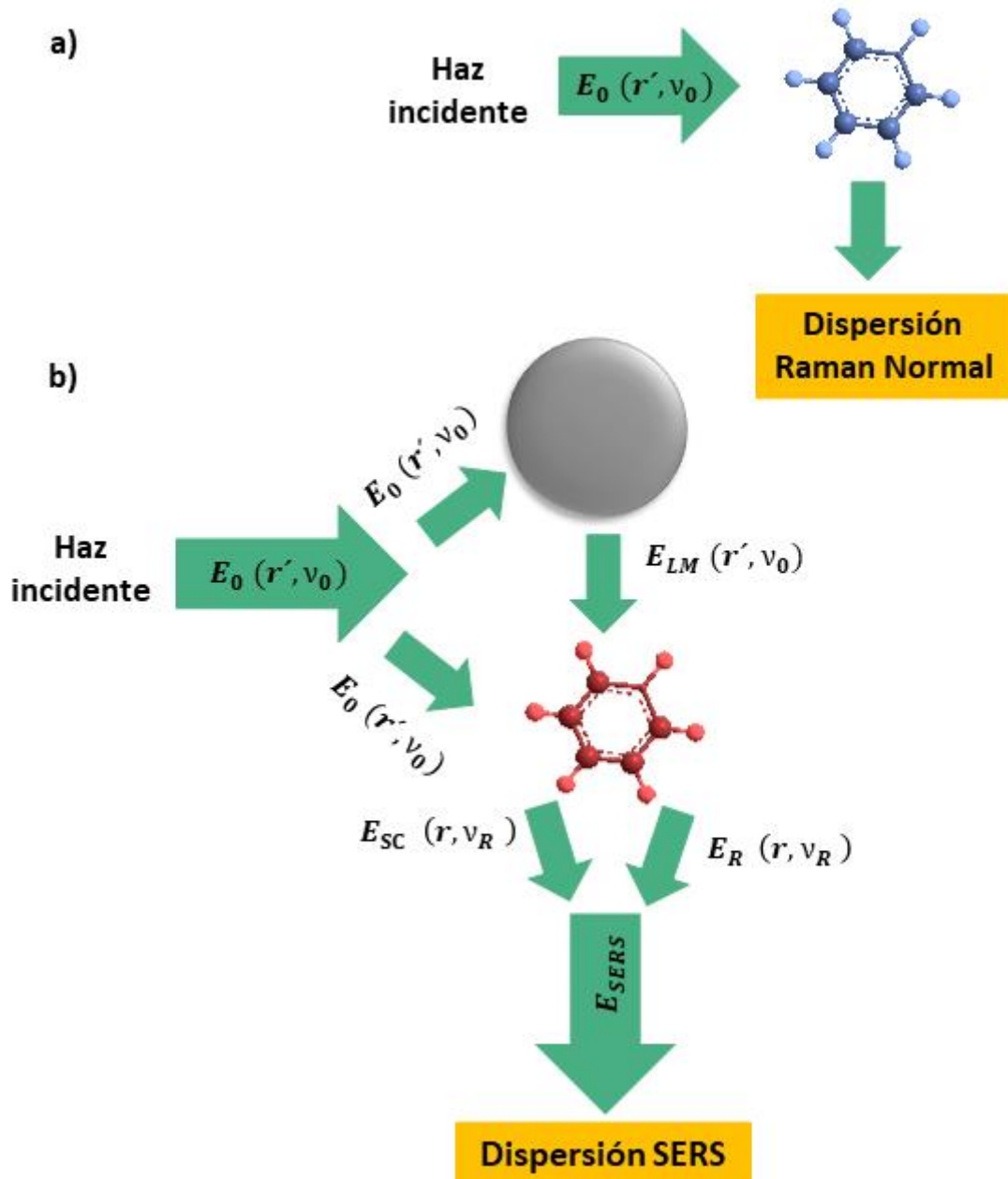


Figura 2.4. Esquema del proceso de dispersión Raman a) en ausencia y b) en presencia de nanopartículas metálicas.

2.3.1.1. Naturaleza del metal

Generalmente, los sustratos SERS son fabricados con materiales que tienen plasmones resonantes con las longitudes de ondas disponibles en las fuentes de excitación empleadas en espectroscopia Raman, como ser oro y plata, pero también son utilizados otros metales como cobre y aluminio. Actualmente, otros tipos de

materiales están siendo estudiados por la capacidad de intensificar las señales de las moléculas, como es el caso particular de los semiconductores y dieléctricos.

Cuando la radiación electromagnética incide sobre una nanopartícula metálica, los electrones de conducción presentes en las mismas son desplazados con respecto a los iones positivos, induciendo la polarización del sistema. Por otro lado, la atracción coulombica entre las cargas positivas y negativas desplazadas actúa como una fuerza restauradora. Los electrones de conducción de la nanopartícula oscilan coherentemente con respecto al campo eléctrico y a la fuerza restauradora generada por la atracción de Coulomb. Esta oscilación coherente de los electrones de conducción del metal es conocida como resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) (**Figura 2.5.**) [1,2,4,12,14]. La misma presenta una frecuencia característica determinada por la forma, tamaño y constante dieléctrica del material de la nanopartícula [15].

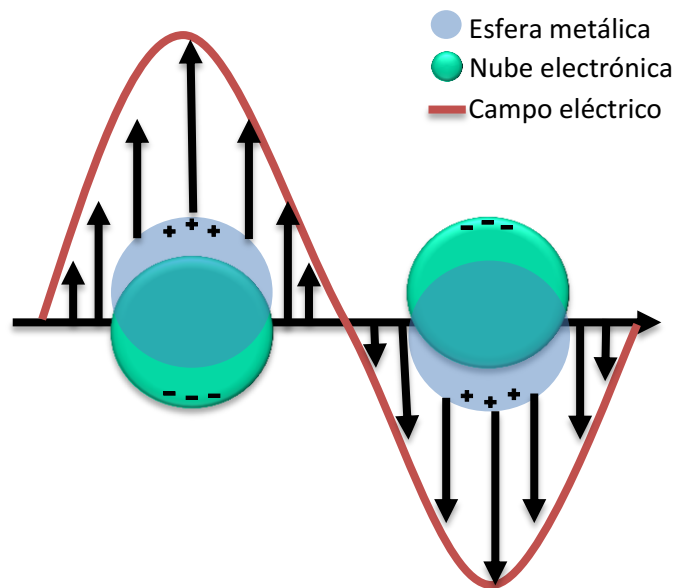


Figura 2.5.: Oscilaciones coherentes de los electrones de conducción de una nanopartícula esférica bajo la acción de un campo eléctrico externo.

La polarización inducida en la nanopartícula por el campo es equivalente a un dipolo puntual situado en el centro de la esfera. El campo generado por este dipolo oscilante se suma al externo, lo que lleva a un campo general más fuerte que el incidente.

En términos de rendimientos, existen muchos factores importantes a tener en cuenta para la fabricación de un sustrato SERS, como ser, costos, facilidad para su preparación, estabilidad química, tendencia a sufrir oxidación, entre otros. En general, los metales más empleados son la plata y el oro debido a su mayor estabilidad química en comparación al cobre o aluminio. Para el caso particular de las plataformas de plata, estas tienden a oxidarse y reaccionar con compuestos presentes en la atmósfera. El cobre y el aluminio tienden a formar capas de óxido cuando se encuentran expuestos al aire; la presencia de estas capas puede alterar el desempeño de los plasmones y llegar a modificar la afinidad de la molécula en estudio por la superficie [4,16].

Por ello, tanto la naturaleza química de las nanopartículas como la longitud de onda de la fuente láser empleada deben ser evaluadas conjuntamente. Como ya se mencionó anteriormente, las nanopartículas de Ag y Au son las más empleadas para la fabricación de sustratos SERS debido a su estabilidad y a que la frecuencia de excitación de los plasmones normalmente se encuentra disponible en las fuentes de láseres empleadas en espectroscopia Raman.

2.3.1.2. Modelo de la esfera metálica: Tamaño de nanopartículas

Las nanopartículas metálicas activas en espectroscopia SERS deben ser pequeñas con respecto a la longitud de onda de la luz incidente; idealmente deben poseer un tamaño en el rango de 5 a 100 nm [14]. El límite superior está determinado por la longitud de onda, ya que por arriba del mismo no se excita exclusivamente a los plasmones dipolares, sino que también se excitan multipolos de orden superior, modos no radiativos, que no son eficientes para producir intensificación Raman y en consecuencia la eficiencia SERS decae. Por otro lado, en el límite opuesto, nanopartículas demasiadas pequeñas disminuyen la conductividad efectiva del metal, modificando sus propiedades electrónicas, e impidiendo ser tratadas como objetos cuánticos.

La polarizabilidad de una esfera metálica de radio R , con función dieléctrica $\epsilon(\lambda)$ en el vacío, está dada por:

$$\alpha = R^3 \frac{(\varepsilon-1)}{(\varepsilon+2)} \quad (2.7.)$$

Combinando esta expresión con la de la función dieléctrica de un metal de Drude¹ ligeramente modificada por las transiciones interbandas², se obtiene:

$$\varepsilon = \varepsilon_b + 1 - \left[\frac{\omega_p^2}{(\omega^2 + i\omega\gamma)} \right] \quad (2.8.)$$

Donde ε_b es la contribución (generalmente dependiente de la longitud de onda) de las transiciones interbandas a la función dieléctrica, ω_p es la frecuencia de resonancia del plasmón metálico, cuyo cuadrado es proporcional a la densidad de electrones en el metal; γ es la resistividad, que es inversamente proporcional al camino libre electrónico, y por lo tanto también inversamente proporcional a la conductividad eléctrica del metal.

Sustituyendo la ecuación 2.8. en la 2.7. se obtiene:

$$\alpha = \frac{R^3(\varepsilon_b\omega^2 - \omega_p^2) + i\omega\gamma\varepsilon_b}{[(\varepsilon_b+3)\omega^2 - \omega_p^2] + i\omega\gamma(\varepsilon_b+3)} \quad (2.9.)$$

La condición de resonancia se da cuando la frecuencia w es igual a:

$$w = \frac{\omega_p}{\sqrt{(\varepsilon_b+3)}} \quad (2.1)$$

La extensión del rango de resonancia viene dado por $\gamma(\varepsilon_b+3)$. Es decir, cuando γ es grande, ya sea por la baja conductividad inherente del metal o porque las partículas son muy pequeñas de modo que la dispersión electrónica en las superficies de las partículas se convierte en el proceso dominante, se reduce la calidad de la resonancia, y con ello la mejora SERS. Así mismo, cuando ε_b es grande, es decir cuando las propiedades dieléctricas del metal están fuertemente modificadas por las transiciones interbandas en el intervalo de longitud de onda, la intensificación SERS disminuye. Esto explica, por qué en iguales condiciones la intensidad SERS de la plata

¹ Según este modelo, un material está formado microscópicamente por una red cristalina en la que existen tanto electrones ligados como electrones libres que pueden moverse por la red.

² Transición electrónica entre bandas de conducción del metal.

es mayor que la del oro y este a su vez, supera al cobre. La contribución de las transiciones interbandas de estos metales a la función dieléctrica en el rango visible del espectro aumenta en dicho orden.

La contribución interbanda a la función dieléctrica afecta también la posición del dipolo del plasmón resonante. Por esta razón, para un sistema de un metal dado, la intensidad SERS dependerá del tamaño de la nanoestructura responsable de la intensificación de la señal Raman. El mismo será óptimo cuando sea pequeño con respecto a la longitud de onda incidente y cuando el tamaño de éste no sea mucho más pequeño que el camino libre de los electrones de conducción, es decir el rango óptimo de tamaño será $\sim 10\text{-}100\text{ nm}$ [14].

2.3.1.3.Efectos de proximidad

Aunque la intensificación SERS es máxima sobre la superficie del metal ($d = 0$, primera capa) el efecto EM es de largo alcance y, por lo general, se extienden hasta al menos 10 nm de distancia de la superficie metálica [1]. Para el caso simple de una esfera metálica, con un diámetro mucho menor que la longitud de onda de la luz, la teoría muestra que G_{SERS}^{EM} es función de la distancia (d) desde la superficie de la nanopartícula metálica de radio (a) y se puede expresar como:

$$\frac{G_{SERS}^{EM(d)}}{G_{SERS}^{EM(0)}} = \left[\frac{a}{a+d} \right]^{12} \quad (2.1)$$

Esta dependencia de la distancia se determinó experimentalmente [17] empleando capas separadoras posicionadas entre la superficie metálica y la molécula objetivo, lo que permitió demostrar el efecto EM de largo alcance en agrupaciones de plata, dando como resultado intensificaciones para distancias menores de $\sim 10\text{ nm}$.

En la práctica, deben ser considerados otros efectos adicionales, como por ejemplo recubrimientos de las nanopartículas de gran tamaño. Entre otros aspectos, las moléculas de la primera capa pueden estar químicamente modificadas por la superficie metálica. La adsorción y las orientaciones de las moléculas pueden ser diferentes en las capas posteriores. Las resonancias LSP (y por lo tanto, las propiedades EM del sustrato) también pueden verse afectadas por la presencia de grandes

recubrimientos [1]. Este enorme gradiente del efecto EM según la distancia del analito a la superficie metálica hace que los modos vibracionales relacionados con los grupos moleculares del analito que se encuentran más cercanos a la superficie den lugar a una mayor intensidad SERS con respecto a los grupos más alejados [18].

2.3.1.4. Factor forma: Agregados y fractales

La eficiencia del mecanismo electromagnético depende de la morfología de la superficie, ya que la radiación dispersada se intensifica en mayor medida en las regiones de mayor curvatura de una superficie rugosa debido a que es ahí donde se acumula la radiación dispersada [2]. Las evidencias experimentales en los últimos años han demostrado que las mayores intensificaciones SERS se obtienen a partir del agregado de NPs y estructuras fractales [19,20].

La interpretación del efecto EM se basa en la idea de “nano-resonadores”. Estas nanoestructuras pueden ser esferas sólidas, estructuras sólidas de diferentes formas (elipsoides, triángulos, cilindros, entre otros.) o agregados de nanopartículas o fractales aleatorios. Es evidente que mientras que una esfera resuena a una frecuencia particular, un esferoide puede resonar a tres frecuencias diferentes, y un fractal aleatorio podría resonar a cualquier longitud de onda dada dentro de una amplia región espectral [21].

El campo electromagnético que experimentan las moléculas que se localizan en pequeñas regiones entre dos partículas es consecuencia de campos locales extremadamente intensificados y, en consecuencia, pueden producir factores de intensificación SERS de $\sim 10^{12}$. Estos son los llamados 'puntos calientes' (del inglés, *hot spots*) detectados en los experimentos SERS [22].

2.3.1.5. El rol de los puntos calientes (*Hot Spots*)

Como se ha mencionado en la sección anterior, la intensificación del campo eléctrico en la superficie de un sustrato metálico es muy heterogénea y se localiza principalmente en regiones espaciales muy pequeñas denominadas "puntos calientes". Desde un punto de vista estructural, estos puntos calientes a menudo se identifican

como puntas finas o como nanospacios entre nanopartículas o entre una nanopartícula y una superficie [23,24].

La razón por la que se generan campos muy fuertes dentro de estos pequeños espacios es debido a que cuando el campo eléctrico está polarizado y atraviesa a un par de nanopartículas genera un exceso de cargas positivas y negativas en los lados opuestos de las mismas. Cuando la polarización del campo eléctrico ocurre en un eje principal de un dímero de nanopartículas (**Figura 2.6.**) (dos nanopartículas separadas por una molécula de analito), estas se acercan, y con ello la separación de cargas superficiales inducidas, por lo tanto aumenta el campo eléctrico entre ellas. Además, la interacción recíproca entre las nanopartículas conduce a un aumento de sus polarizaciones, es decir, cada nanopartícula, “siente” el efecto del campo externo más el efecto polarizador de las cargas inducidas en las nanopartículas cercanas.

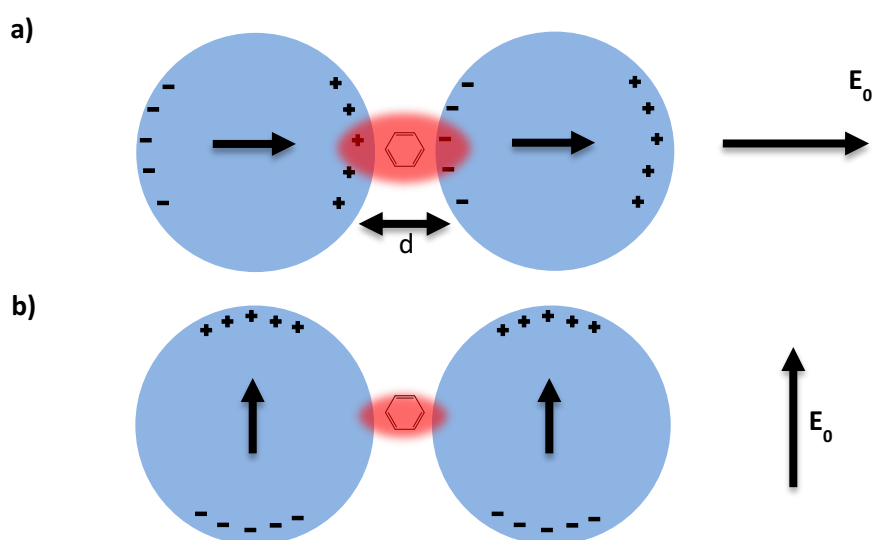


Figura 2.6.: Dímero formado por dos nanopartículas, separadas por un pequeño espacio donde se ubica una molécula, polarizadas por acción de un campo eléctrico externo E_0 . El campo eléctrico está polarizado a) a lo largo del eje principal del dímero, b) perpendicularmente al eje del dímero. Las flechas dentro de las nanopartículas representan los dipolos inducidos.

El efecto de intensificación ocurre cuando el campo eléctrico externo está polarizado a lo largo del eje principal, pero no ocurre cuando la dirección del campo polarizado es perpendicular al eje de las nanopartículas, ya que la distancia entre las

cargas negativas y positivas en diferentes nanopartículas no es suficientemente pequeña y los dipolos inducidos no están orientados de una manera que permita su refuerzo mutuo [14].

Adicionalmente, se ha determinado cómo se distribuye espacialmente el campo local dentro de un punto caliente y cómo el factor de intensificación SERS es mayor a menores separaciones entre las partículas. Esto podría ser una explicación de por qué el efecto SERS es más frecuente cuando las partículas se encuentran agregadas y rara vez en partículas aisladas [13]. Sin embargo, existe un límite en el incremento del campo para distancias muy pequeñas ($d < 1$ nm), debido a fenómenos de la mecánica cuántica [4].

Estas consideraciones sugieren la importancia de promover la formación de puntos calientes del orden de la molécula en estudio para obtener grandes señales SERS.

2.3.1.6. Reglas de selección: Orientación superficial

La comprensión de las reglas de selección es fundamental para la espectroscopia SERS, ya que determina la actividad o no de los modos normales. Cuando la intensidad de un modo normal aumenta en el proceso de dispersión SERS respecto al Raman normal, el mecanismo electromagnético permite explicar en la mayoría de los casos esta intensificación [25,26].

La intensificación de los modos vibraciones de los espectros Raman de las moléculas se diferencian en SERS debido a la presencia de nanopartículas metálicas, que provocan la intensificación de algunos modos vibracionales por la presencia de una de las componentes del momento dipolar normal a la superficie metálica. A diferencia del caso de la espectroscopia Raman normal, se debe considerar tanto el estado de polarización del haz incidente como el del haz dispersado.

La intensidad SERS es diferente entre campos perpendiculares y paralelo, afectando de diferente manera a las componentes de polarizabilidad de la molécula. Esto sugiere la existencia de tres clases de modos de vibración, con un comportamiento espectral distinto dependiendo de la longitud de ondas:

(1) Los modos excitados solo por la componente normal del campo eléctrico y que dan como resultado un dipolo inducido con una componente fuerte solo en dirección perpendicular a la superficie (α_{zz});

(2) Los modos excitados solo por la componente paralela del campo eléctrico y que dan como resultado un dipolo inducido con una fuerte componente paralela a la superficie (α_{xx} , α_{yy} y α_{xy});

(3) los modos mixtos (α_{xz} y α_{yz}) (por ejemplo, un campo normal que excita un dipolo con una fuerte componente paralela a la superficie) [26].

Las diferencias en la intensidad SERS para la mayoría de las vibraciones de las moléculas están relacionadas con la simetría del tensor de polarizabilidad Raman de las diferentes vibraciones (paralelas o perpendiculares a la superficie). Esto permite que un espectro SERS pueda proporcionar información sobre el sitio de adsorción, la orientación de la molécula adsorbida y la interacción de unión entre la molécula adsorbida y la superficie.

En general, el grado de cumplimiento de estas reglas de selección depende de la naturaleza de las vibraciones; siendo adecuadas aquellas que correspondan a modos vibracionales que se transformen mayoritariamente según una sola componente de la polarizabilidad, produciendo grandes cambios de intensidad entre la orientación paralela y perpendicular. En este sentido, las moléculas de gran simetría, como por ejemplo el benceno, se han estudiado tanto experimental como teóricamente en diferentes superficies, lo que permitió determinar que las vibraciones de estiramiento C–H de moléculas planas cumplen con esta condición al modificar su componente de polarizabilidad en el plano, haciendo posible su empleo para la determinación de la orientación de un analito sobre la superficie metálica [27,28].

Existen modos vibracionales prohibidos que se han observado en los espectros SERS, evidenciando la existencia de distintas interpretaciones de las reglas de selección. Básicamente, no refleja el cambio en el campo electromagnético sino el cambio de polarizabilidad.

Los avances de métodos de modelado y técnicas computacionales han permitido un avance en la comprensión de las interacciones de las moléculas con la

superficie. Sin embargo, la continua aparición de nueva evidencia experimental conduce a nuevos desafíos.

2.3.2. Mecanismo químico o de transferencia de carga (CT)

La contribución del mecanismo químico ha sido motivo de gran debate durante muchos años. A diferencia del mecanismo EM, el efecto químico es capaz de explicar la dependencia observada entre la intensificación selectiva de ciertas bandas SERS con la naturaleza de la especie química adsorbida y con el potencial eléctrico de interfase [29]. Por otro lado, se centra exclusivamente sobre la primera capa de moléculas de adsorbato en contacto directo con la superficie metálica.

La nube electrónica del adsorbato puede distorsionarse por la interacción con la superficie metálica nanoestructurada. La adsorción es generalmente un proceso exotérmico. Si la entalpía molar de adsorción es ~ -25 kJ/mol, la interacción es denominada fisisorción, mientras que, si es de ~ -40 o mayor kJ/mol, comparable a la energía de enlace químico, el proceso se denomina quimisorción. A lo largo de este trabajo fueron estudiados dos fungicidas, tiabendazol y carbendazim (**Figura 2.7.**), que se adsorben a la superficie de plata mediante el proceso de fisisorción.

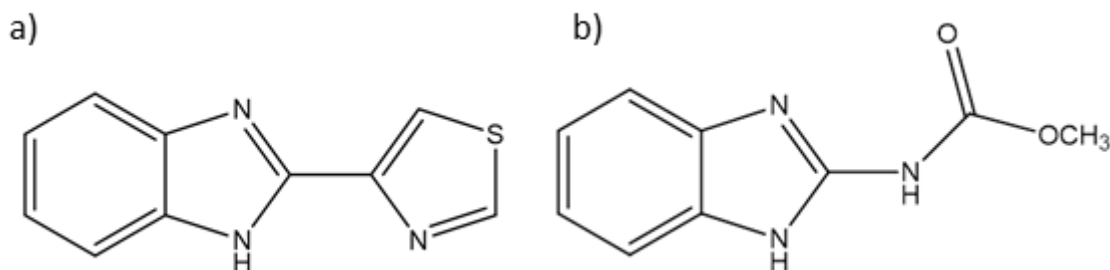


Figura 2.7.: Estructura molecular de a) Tiabendazol; b) Carbendazim.

La quimisorción involucra cambios drásticos en la nube electrónica de las moléculas, principalmente en moléculas pequeñas; en efecto, modifica las propiedades y lo que se obtiene es una “nueva molécula o complejo superficial”, con diferente simetría y estados electrónicos [2]. Los espectros SERS de las especies quimisorbidas requieren de un nuevo análisis vibracional, ya que uno puede estar frente a un espectro vibracional completamente diferente al de la molécula de

adsorbato puro. Sin embargo, desde el punto de vista de la intensificación SERS, la adsorción directa sobre la superficie proporciona un factor de intensificación EM más elevado con respecto a las moléculas que se encuentran más alejadas de la superficie de las nanopartículas, que da lugar al efecto de la primera capa [30]. Por ejemplo, la molécula de tiram (dimetil-ditiocarbamato), fungicida estudiado en este trabajo, se disocia a través del enlace disulfuro al interactuar con la superficie de las nanopartículas de plata, uniéndose a la superficie metálica mediante los átomos de azufre (**Figura 2.8.**). Como consecuencia, el espectro SERS del analito adsorbido (complejo superficial), corresponde a una especie diferente de la molécula de partida y por lo tanto, es necesario realizar un nuevo análisis y asignación vibracional [31,32]. La intensificación SERS global se debe al efecto multiplicativo generado por el mecanismo EM así también como por un efecto de intensificación generada por una transición de transferencia de carga (CT) entre el metal y el adsorbato o viceversa.

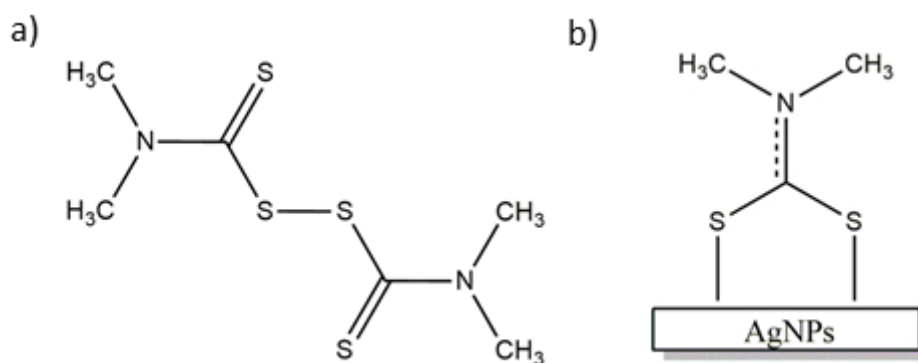


Figura 2.8.: a) Molécula de tiram libre; b) Molécula de tiram adsorbida sobre la superficie de nanopartículas de plata.

La fisorción también distorsiona la nube electrónica de las moléculas, lo que lleva a pequeñas modificaciones en la polarizabilidad del analito (α), permitiendo diferenciarse de moléculas aisladas. Sin embargo, podemos esperar que el espectro SERS se parezca al espectro Raman normal debido a las pequeñas modificaciones que sufre la nube electrónica al interactuar con la superficie. Además de los cambios derivados de la polarizabilidad, la fisorción puede inducir una orientación fija, intensificando los modos vibracionales dependiendo de su simetría.

Dos mecanismos diferentes contribuyen al mecanismo químico. El *efecto químico no resonante* es el que la interacción con el metal no genera un nuevo estado electrónico, pero sin embargo induce apreciables cambios geométricos y de la estructura electrónica de la molécula, provocando modificaciones en los desplazamientos Raman y las intensidades de los modos vibracionales. Por otro lado, en el *efecto químico resonante con transferencia de carga*, la interacción de la molécula con la superficie metálica implica la formación de un estado de transferencia de carga entre el metal y la molécula. Además, si se excita con un láser en resonancia o preresonancia con este estado, algunos modos Raman pueden ser fuertemente intensificados, proceso conocido como dispersión Raman resonante (RRS) [4].

Durante el desarrollo de la Tesis se empleó azul de metileno (MB) para el estudio de la eficiencia SERS de los sustratos fabricados. El MB presenta una fuerte absorción electrónica alrededor de 650 nm (**Figura 2.9.**) que en conjugación con la longitud de excitación del láser seleccionado (647,1 nm) permitió realizar experiencias SERRS, dando lugar a grandes intensificaciones como consecuencia de la contribución de la superficie metálica y por efecto de resonancia con la excitación electrónica. El estudio completo del MB será discutido en el Capítulo 6.

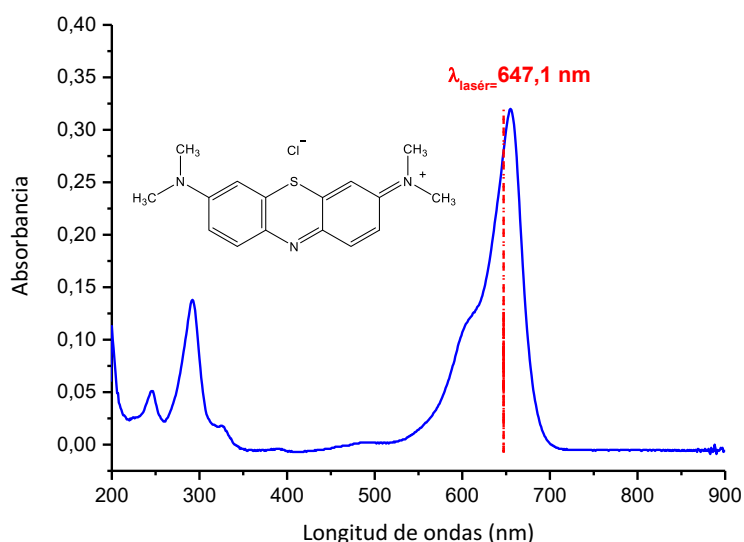


Figura 2.9.: Espectro de absorción UV-Vis de una solución etanólica $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ de MB. Máximo de absorción $\sim 655 \text{ nm}$. Rango 200-900 nm; celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

2.3.2.1.SERS de moléculas quimisorbidas sin resonancia de CT

Si una molécula que se encuentra quimisorbida sobre una superficie metálica y no presenta absorción electrónica en la región espectral de excitación, la identificación y caracterización del enlace que une el adsorbato a la superficie metálica es fundamental para la interpretación de los espectros SERS. En general, para nanoestructuras de Ag la interacción del analito (adsorbato) se realiza a través de la formación de un enlace Ag–N, Ag–S, Ag–O o Ag–X (X = halógeno), observadas en la región espectral comprendida entre 300-100 cm^{-1} [2]. La identificación de esta banda (metal-molécula) no siempre resulta sencilla, debido a la presencia de especies superficiales como óxidos y haluros que pueden interferir.

El espectro SERS observado para el complejo superficial puede ser elucidado teniendo en cuenta los modos vibracionales fundamentales del complejo, la orientación molecular y la polarización de la luz en la superficie metálica, es decir, empleando las reglas de selección. Actualmente, el uso de cálculos químicos cuánticos computacionales resulta una herramienta común, accesible y eficiente empleada como complemento de la técnica SERS, facilitando el análisis y la asignación de los espectros [33].

La identificación del complejo superficial podría ser el principal obstáculo en la interpretación espectral. Esto ocurre cuando existen varios sitios competitivos para la adsorción dentro de la misma molécula, o cuando se lleva a cabo una fotodegradación tan grande que modifica la estructura del producto inicial [2,34].

2.3.2.2.SERS de moléculas quimisorbidas con resonancia de CT

El efecto SERRS puede ser considerado como una variación del proceso CT. Esta situación puede producirse cuando la longitud de onda de excitación del láser iguala la diferencia entre el nivel de Fermi del metal y las energías HOMO o LUMO del analito desencadenando un mecanismo de transferencia de carga. Este fenómeno fue evidenciado particularmente en medidas electroquímicas [35]. El mecanismo de CT pueden dividirse en dos grupos:

➤ Fenómenos que implican la transferencia de carga de un electrón del nivel de Fermi del metal a un orbital molecular desocupado del adsorbato o viceversa.

➤ La dispersión Raman resonante SERRS del complejo superficial.

La transferencia de carga tiene lugar entre el nivel de Fermi de la nanoestructura metálica y el orbital molecular desocupado de menor energía (LUMO) de la molécula adsorbida, o al revés desde el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) al metal (**Figura 2.10.**).

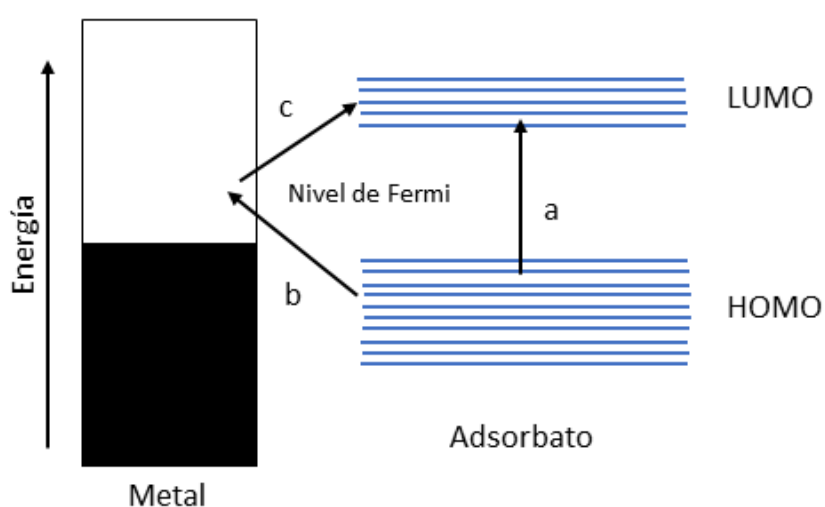


Figura 2.10.: Representación esquemática del mecanismo de transferencia de carga en SERRS. Transición electrónica en el complejo metal-molécula (a), o transferencia de carga del metal a la molécula (b+c).

Cuando la línea del láser empleado para la excitación se encuentra en resonancia con una transición electrónica, por ejemplo transición metal-molécula, se produce el fenómeno de Raman Resonante. Por otro lado, la línea del láser podría estar en resonancia con el plasmón de las nanopartículas superficiales, dando lugar a la observación del fenómeno SERRS, el cual está limitado a moléculas directamente adsorbidas a la superficie metálica efecto de la primera capa [36,37].

La existencia de transferencia de carga es función de la naturaleza del adsorbato y el metal, siendo en general más probable en moléculas que presentan electrones π en su estructura.

2.4. Fluorescencia del analito o contaminantes

El efecto Raman es un fenómeno muy débil, es decir, produce señales de 6 a 10 órdenes de magnitud más pequeñas que las de la fluorescencia [1]. Por lo tanto, la fluorescencia del propio analito o de las impurezas, incluso en trazas, puede superar a la señal Raman. Es evidente que en ausencia de señal de fondo (o *background*) se logra el mejor espectro Raman, mientras que cuanto mayor sea el fondo será más difícil detectar las señales provenientes de la dispersión Raman. Es decir, la misma banda Raman puede ser bien visible cuando la señal del fondo es débil, pero en presencia de un fondo intenso puede verse tapada. En estos casos, en general, no es posible obtener el espectro Raman mediante una simple sustracción del fondo [38].

En general, la fluorescencia es parcialmente atenuada en los espectros SERS debido a que los metales suelen apagarla [39,40]. Sin embargo, la fluorescencia puede aún ser un problema, en el caso que sea generada por moléculas que no se adsorben en el sustrato metálico. Por ejemplo, si el analito se disuelve en una solución de nanopartículas, es probable que parte de él no sea adsorbido en la superficie de las nanopartículas.

Normalmente, el problema de la fluorescencia se atenúa utilizando líneas de excitación en el infrarrojo cercano (por ejemplo 785 o 1064 nm), donde es menos probable que se exciten las transiciones electrónicas de los analitos, de las impurezas o de los materiales utilizados como soportes para fabricar los sustratos SERS.

2.5. Sustratos para espectroscopia SERS

Desde el punto de vista práctico, los sustratos SERS deben presentar varias características para que tengan buenos rendimientos. Algunas de ellas son: buen factor de intensificación de las señales, uniformidad, reproducibilidad, estabilidad en el tiempo, bajos costos y facilidad en su elaboración [1,4].

Usualmente, aquellos sustratos uniformes y reproducibles agilizan el trabajo, ya que no es necesario evaluar muchos puntos (o *spots*) en el sustrato para determinar la zona más eficiente, y además los resultados suelen ser reproducibles de sustrato a sustrato. Ambas características son críticas en el caso de querer llevar a cabo medidas

cuantitativas. Por otro lado, los sustratos deben poder conservar su rendimiento en el tiempo. La facilidad y el costo de su elaboración también juegan un papel importante a la hora de evaluar los sustratos.

La elección del sustrato está muchas veces determinada por sus usos y aplicaciones, ya que usualmente para análisis cuantitativos se requieren preferentemente sustratos uniformes y reproducibles, mientras que, para detección de moléculas trazas se necesita una buena intensificación de las señales (G_{SERS}). En general, los sustratos de gran poder de intensificación requieren pequeñas separaciones entre sus nanopartículas metálicas, lo cual es posible de obtener fácilmente, por ejemplo, mediante la aglomeración de NPs. Sin embargo, esto conlleva una pérdida en el control de la morfología de los sustratos y por ende de la reproducibilidad de las medidas. Por otro lado, los métodos litográficos permiten fabricar estructuras con un control preciso y reproducible de la morfología, pero los espacios entre las nanopartículas son significativamente mayores [41].

La detección SERS puede ser llevada a cabo mediante dos sistemas diferentes, detección SERS directa e indirecta [4,42,43]. En las próximas secciones se describirán ambos mecanismos de detección.

2.5.1. Sustratos para la detección directa

Los mecanismos de detección SERS *directos* son aquellos que permiten identificar compuestos a través de su propio espectro Raman, como en el caso de moléculas orgánicas, contaminantes como muchos pesticidas, y colorantes alimentarios [43,31]. Aunque este procedimiento de detección es más sencillo, presenta una dificultad en aplicaciones biológicas o biomédicas, ya que normalmente las biomoléculas se caracterizan por bajas señales y suelen encontrarse en medios o matrices que pueden llegar a interferir con las señales SERS de la biomolécula misma. Dentro de este grupo podemos encontrar los agregados de nanopartículas en solución, nanopartículas ensambladas a una superficie y nanopartículas ordenadas en matrices que serán detallados en la sección.

2.5.1.1. Agregados de nanopartículas en solución

Actualmente, los coloides metálicos de Ag u Au son los más empleados para experimentos SERS en solución, ya que son relativamente fáciles de obtener en laboratorios, generan grandes intensificaciones SERS y generalmente perduran durante largos periodos de tiempo sin cambios significativos. Habitualmente se obtienen por un proceso de nucleación y de crecimiento promovido a partir de la reducción química de cationes metálicos. La resonancia de los plásmos localizados en estos casos se encuentra, generalmente, entre 400 y 500 nm para plata y oro, respectivamente [1]. Las partículas coloidales tienden a agregarse por lo que es necesario estabilizarlas para conservar su estado y evitar la pérdida de sus propiedades. Para ello, usualmente se emplean agentes estabilizantes electrostáticos y de impedimento estéricos (polímeros o tensioactivos) o una combinación de ambos que recubren la superficie de los coloides y evitan que se agreguen (*capping agents*). En algunos casos, un solo compuesto químico cumple el papel de agente reductor y estabilizador; este es el caso de los coloides reducidos con citrato de sodio, uno de los reductores más empleados en la fabricación de sustratos SERS. Dentro de los protocolos más conocidos y utilizados que emplean citrato de sodio como reductor puede mencionarse el de Lee&Meisel [44]. Asimismo, otros agentes reductores como NaBH_4 [45], hidracina, hidroquinona y ácido ascórbico son utilizados en conjunto con una amplia variedad de estabilizantes como PVP (polivinilpirrolidona), dextrano, hidroxilamina, entre otros [46].

En los últimos años, se han realizado grandes esfuerzos para tener control de la morfología y tamaño de las NPs de Ag y Au; actualmente existen muchos trabajos donde se reportan las síntesis de nanobarillas, nanocubos, nanoestrellas, etc. para mejorar sus propiedades SERS [47].

Un método eficiente para incrementar las señales SERS en solución consiste en inducir la agregación de las nanopartículas, lo que es posible de obtener mediante la adición de una sal (por ejemplo, NaCl , NaNO_3 , entre otros). El aumento de la fuerza iónica de la solución reduce la repulsión de las cargas estabilizadoras en la superficie de las nanopartículas induciendo su agregación [48]. El propio analito muchas veces puede desempeñar este papel si es un colorante iónico o si, debido a sus grupos

funcionales, desplaza a los ligandos estabilizantes de la superficie de las nanopartículas. Se han propuesto en numerosos trabajos métodos para mejorar la reproducibilidad basados en la agregación de nanopartículas coloidales [49,50] en los que se concluye que una elección adecuada de las condiciones experimentales permite controlar, en muchos casos, el proceso de agregación.

El uso de la agregación de dispersiones de nanopartículas es un método práctico para la detección SERS, ya que en general son fácilmente sintetizables y, en condiciones adecuadas, proporciona grandes factores de intensificación. Un inconveniente de este método es que el proceso de agregación es difícil de controlar [51] y, a menudo, conduce a resultados poco reproducibles, lo que dificulta la implementación del análisis cuantitativo.

2.5.1.2. Nanopartículas ensambladas a una superficie

En los sustratos nanoestructurados, a diferencia de lo que ocurre en las suspensiones coloidales, los nanomateriales metálicos que promueven el efecto SERS se encuentran en una configuración geométrica fija. Algunas de las técnicas empleadas para su preparación se mencionan a continuación:

➤ Electrodeposición

Las técnicas electroquímicas resultan muy versátiles para la generación de superficies metálicas nanoestructuradas debido a que las condiciones experimentales son fáciles de ajustar, y además a la posibilidad de obtener nanoelectrodos con diferentes tamaños, formas y distribuciones. La preparación electroquímica de sustratos nanoestructurados puede realizarse a través de dos mecanismos generales: el rugosado electroquímico (ER) y la electrodeposición (ED). Ambos pueden llevarse a cabo en un sistema de celda de dos o tres electrodos, dependiendo de si el proceso se realiza en condiciones galvanostáticas (corriente constante) [52] o potencioestáticas (potencial constante) [53], siendo esta última la opción más común. Los sustratos obtenidos por métodos electroquímicos presentan la ventaja de poseer una gran área, con buena capacidad SERS y reproducibilidad [52,54].

➤ Nanopartículas adsorbidas en superficies sólidas

Uno de los métodos más conocidos para ensamblar nanopartículas a una superficie consiste en silanizar con 3-aminopropil-trimetoxisilano (APTMS) una superficie de vidrio (por ejemplo, un portaobjeto), por inmersión en una solución del mismo. El aminosilano se une covalentemente al silicio de la superficie de vidrio, formando una capa de carga positiva hacia el exterior, debido al grupo amino protonados [55]. En una segunda etapa, los grupos terminales $-NH_2$ del APTMS son sumergidos en una solución de nanopartículas de Ag o Au que se autoensamblan en la superficie formando una monocapa [56,57,58]. De esta manera se forma una matriz de NPs estrechamente espaciados, con propiedades SERS óptimas [56]. La inmovilización controlada de nanopartículas sobre una superficie mejora la reproducibilidad de un sustrato [59]. Este método es muy versátil ya que en la superficie se pueden ensamblar varios tipos de nanopartículas (con diferente tamaño, forma y composición); además, el sustrato de soporte puede ser de otros materiales, como silicio, teflón, etc. [57]. Esta técnica permite obtener sustratos que producen buenas intensificaciones y reproducibilidad SERS [56,57,60].

➤ Nanopartículas en sustratos flexibles

Recientemente, los sustratos SERS flexibles han surgido como una alternativa interesante, ya que presentan la ventaja de poder explorar diferentes superficies, simplemente con frotarlas con el sustrato o en muchos casos solo apoyándolos sobre la superficie a analizar. Esto facilitó el estudio de contaminantes presentes en diferentes superficies, como en los alimentos, debido a su capacidad para combinar la detección sensible, *in situ*, y no destructiva [61,62,44]. Dentro de los materiales flexibles más empleados se encuentran: papel, nanocelulosa, tela de algodón, cinta adhesiva, gel de agar, biomateriales entre otros [63,64,65].

En forma general, la fabricación de estos sustratos implica una primera etapa de preparación de una dispersión coloidal, y una subsecuente etapa se coloca las NPs sobre un soporte o en una matriz que puede ser de naturaleza variada. Durante esta etapa, los nanomateriales metálicos son depositados y adsorbidos sobre el sustrato por estrategias como *drop-coating* [66], *dip-coating* [67], *ink-jet* [68], etc.

➤ Escritura directa con láser

Las nanopartículas metálicas en una superficie se pueden sintetizar fotoreduciendo un precursor de Ag u Au. Lee y col. [69] depositaron una solución que contenía HAuCl_4 , polivinilpirrolidona (PVP) y etilenglicol sobre una superficie de vidrio funcionalizada con APTMS. Esto permitió la fabricación de microestructuras, formadas por nanopartículas de Au casi esféricas agregadas cuyo tamaño era controlable variando la concentración de PVP. El etilenglicol promovió la reducción de Au, mientras que la funcionalización del vidrio con APTMS resultó ser importante para anclar firmemente la estructura metálica al vidrio. Xu y col. [70] adoptaron un procedimiento análogo para escribir un patrón de Ag activa en SERS en un circuito microfluídico, a partir de una solución que contenía AgNO_3 , citrato trisódico y amoníaco.

La principal ventaja de este método radica en la posibilidad de crear microestructuras con actividad SERS de la forma deseada, además es posible emplear la técnica de escritura directa con láser en medios fluidos [71].

2.5.1.3. Nanopartículas ordenadas en matrices (estructurados)

La electrodeposición asistida por plantilla (TAED, del inglés *template-assisted electrochemical deposition*) permite la electrodeposición de metales con geometría y disposición controladas mediante el uso de plantillas inorgánicas ordenadas, como sílice [72], alúmina [73], o membranas de policarbonato de plantilla polimérica o microesferas de poliestireno [74]. Las membranas poliméricas o microesferas se comercializan, así como las membranas de alúmina ordenadas que, sin embargo, pueden prepararse por anodización de una hoja de aluminio o de una película delgada de aluminio depositada por pulverización catódica sobre un material conductor. La anodización provoca la formación de matrices con canales y disposiciones regulares de poros a través de la autoorganización [73,75]. Independientemente del tipo de plantilla, la electrodeposición de metal se lleva a cabo en condiciones galvanostáticas mediante electrodeposición de corriente alterna o constante, después de lo cual se retira la plantilla dejando nanoestructuras metálicas independientes [76].

Otros métodos muy empleados para la fabricación de sustratos SERS estructurados es el proceso de litografía por haz de electrones (EBL, del inglés *electron-beam lithography*), el cual consiste inicialmente en dibujar el patrón deseado mediante un haz de electrones enfocado en un polímero sensible a los electrones, llamado *resist*³. La exposición al haz de electrones provoca modificaciones en la solubilidad del resist, causando que la resist positiva se vuelva soluble, mientras que la negativa insoluble, luego de ser sometida a la exposición. En un segundo paso, la muestra se revela sumergiéndola en un solvente que elimina la porción soluble del resist, generando el patrón deseado [77]. Este método de fabricación de sustratos SERS permite controlar con precisión la geometría del sustrato y por lo tanto su reproducibilidad con la agregación de las nanopartículas [78]. Por otro lado, la técnica EBL no es adecuada para generar sustratos de gran área ya que es un método muy costoso [77].

2.5.2. Sustratos para la detección indirecta

Los sistemas de detección SERS *indirectos* suelen ser más complejos y hacen referencia al uso de marcadores, es decir, a moléculas intermediarias que están diseñadas para unirse selectivamente a la molécula o analito que se desea determinar. En este caso, el analito de interés se detecta a través del espectro del intermediario. Estos sustratos son comúnmente empleados cuando la molécula en estudio se encuentra en una matriz compleja, presumiblemente con baja señal como en el caso de virus y bacterias en fluidos biológicos.

Como se puede observar en la **Figura 2.11.**, los sustratos para la detección indirecta están formados esencialmente por un núcleo plasmónico, una molécula intermediaria o marcador/indicador SERS y una cubierta protectora funcionalizada de manera de adsorber selectivamente al analito de interés.

³ Fina capa que se deposita y que es usada para transferir el patrón de un circuito al sustrato semiconductor.

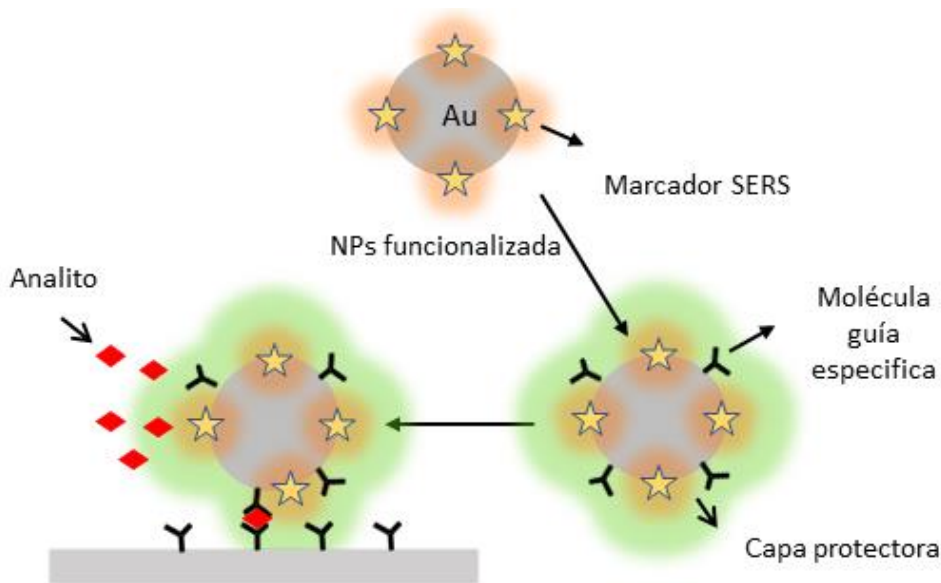


Figura 2.11.: Sustratos de detección indirecta, formado por el núcleo plasmónico, un marcador SERS y la cubierta protectora. Esquema basado en la referencia [4].

El núcleo plasmónico es preferentemente de oro, debido a su biocompatibilidad comparada con la plata [79]. Las moléculas intermediarias/marcadoras deben ser fotoquímicamente estables y poseer una gran sección transversal como por ejemplo el catión cristal violeta o el verde de malaquita [80]. Con ellos es posible obtener una intensificación por efecto Raman resonante, si la longitud de onda de excitación coincide con el máximo de absorción de estas especies, lo que provoca un incremento de las señales. Sin embargo, el sistema puede experimentar fenómenos de calentamiento lo que podrían destruir las moléculas indicadoras. Otra opción es el empleo de moléculas orgánicas pequeñas que produzcan buenas señales Raman y que se adhieran fácilmente a la superficie metálica. El indicador no debe interferir con las señales de la matriz u otros analitos. La capa protectora tiene la función de evitar que las nanopartículas se agreguen y evitar el desprendimiento del indicador de la superficie metálica, empleándose usualmente silica [81] o polietilenglicol (PEG) [82]. Adicionalmente, la capa protectora se encuentra funcionalizada de manera de unir selectivamente el analito de interés.

2.5.3. Sustratos comerciales

Actualmente, existen varias empresas (*Sigma-Aldrich-Merck, Horiba Scientific*, entre otros) que comercializan nanopartículas metálicas de diferentes formas, así como también sustratos SERS sólidos.

Hoy en día se comercializan nanopartículas de plata y oro en solución de diferentes formas (esféricas, varillas, placas) y tamaños (5 a 400 nm), con diferentes tipos de protección. Por ejemplo, *Silmeco* (Copenhague, Dinamarca) ofrece sustratos SERS sólidos formados por una matriz de nanopilares de silicio, sobre los cuales se deposita una capa de plata u oro. La evaporación del solvente hace que los pilares colapsen entre sí, formando puntos calientes. Por lo general, es posible modificar las características de los sustratos SERS dependiendo de las necesidades requeridas [4].



Figura 2.12: Sustratos comerciales de plata u oro ofrecidos por la marca Ocean Insight [83].

2.5.4. Caracterización de los sustratos

La caracterización de los sustratos SERS luego de su fabricación es el primer paso para posteriormente poder interpretar las señales SERS del sistema.

La estructura de un sustrato SERS, así como el tamaño y la forma de las nanopartículas, juegan un papel crítico en las propiedades del plasmón resonante y el mecanismo electromagnético. EL método más directo para determinar la morfología y distribución de tamaño es la microscopía electrónica. Dentro de ellas, la técnica más empleada es la microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*), mediante la cual es posible obtener información precisa de la distribución

de tamaños y de formas. Por otro lado, también es posible usar, muchas veces de manera alternativa, la microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscopy*).

Sin embargo, para la caracterización de dispersiones de NPs lo más habitual y sencillo en un laboratorio es llevar a cabo primero la caracterización a través de mediciones por espectroscopia UV-Vis, ya que provee información de manera rápida y sencilla. Los espectros UV-Vis exhiben normalmente uno o más picos asociados con la longitud de onda correspondiente a las resonancias del plasmón localizado. Por otro lado, estos picos suelen variar debido a la falta de homogeneidad y a la agregación que en muchos casos suelen sufrir las nanopartículas. Se espera que la mayor intensificación SERS ocurra cuando la longitud de onda del láser incidente SERS sea cercana a la longitud de onda de resonancia de los plasmones [2].

2.6. Aplicaciones de la espectroscopia SERS

La espectroscopia SERS se ha empleado para la detección de aditivos alimentarios o contaminantes [47,84], explosivos y armas de guerra [85], especies biológicas [86], en ciencia forense para la detección de drogas ilícitas [87,88], en la conservación de obras de artes [89], para monitorear reacciones catalizadas por superficies metálicas o nanopartículas, entre otros usos. Es importante destacar que este amplio rango de aplicaciones se ha visto beneficiado significativamente por el empleo de espectrómetros Raman portátiles, permitiendo determinaciones *in situ*. Así mismo, en los últimos tiempos se han desarrollado una gran variedad de sustratos con diferentes características, para reducir el costo, aumentar la velocidad de análisis, simplificar la operación de medida, con posibilidad de realizar medidas *in situ*, y con altos grado de intensificación. Dentro de la enorme cantidad de trabajos publicados, a continuación se exponen algunos de ellos que permiten visualizar la gran variedad de aplicaciones de la técnica.

➤ En la identificación de armas de guerra química y explosivos, se ha empleado espectrómetros portátiles con sustratos SERS de Ag para determinar la viabilidad celular luego de 24 h de exposición de una muestra a CEES (sulfuro de 2-cloroetil etilo), molécula similar a la empleada como arma química, conocida como gas mostaza. En

este contexto, se ha estudiado la posibilidad de detección de otras moléculas explosivas, como por ejemplo DNT (2,4-dinitrotolueno) en distintos estados de agregación empleando diferentes sustratos SERS [85,90]. La identificación de armas de guerra química y de explosivos constituye hoy en día un tema crucial por lo que resulta esencial su detección rápida e *in situ*.

➤ El análisis y monitoreo ambiental está estrictamente relacionado con la caracterización de trazas de contaminantes (como aniones poliatómicos, iones de metales pesados y compuestos orgánicos) presentes en el ecosistema (agua, suelo, ríos, etc.) [91]. Se han utilizado sustratos de Ag y Au recubiertos con iones característicos como tioles catiónicos con el fin de aumentar la afinidad del analito a la superficie del sustrato SERS, obteniendo límites de detección en el orden de concentración de ppb-ppm. Se ha demostrado que la adsorción de los aniones en los recubrimientos de las nanopartículas es instantáneo y reversible, permitiendo su monitoreo continuo en tiempo real [92].

➤ En el campo de la preservación de obras de arte y patrimonio cultural, es de suma importancia lograr la detección ultrasensible de colorantes y pigmentos naturales y sintéticos. La identificación de colorantes y pigmentos específicos puede ser beneficiosa para la preservación a largo plazo de obras de arte y, además, puede revelar su contexto histórico y eventuales falsificaciones. Esto se hace posible debido a la naturaleza no destructiva de la técnica y su alta sensibilidad [89].

➤ La evolución de la espectroscopia SERS ha permitido avances en los métodos de detección de distintas drogas de uso ilícito como son por ejemplo; cocaína, opio, morfina, fentanilo, entre otros, que causan grandes complicaciones a los consumidores tanto físicos como mentales. Si bien hoy en día existen numerosas técnicas que permiten detectar estas drogas o fármacos como: CG-MS; HPLC; difracción de rayos x, entre otras; los mismo requieren mucho tiempo como procesos extensivos resultando no ideales para determinaciones *in situ* de rutina [13,88]. Mediante la espectroscopia SERS se han logrado detectar y en muchos casos cuantificar drogas ilegales en diferentes matrices de estudio incluyendo fluidos biológicos como por ejemplo saliva y orina [93,94]. La mayoría de las drogas ilegales contienen sistema de anillos

conjugados, que resultan buenos a la hora de realizar medidas de espectroscopia SERS por sus grandes intensificaciones.

➤ La creciente demanda de alimentos en los últimos años ha llevado a los productores al uso excesivo y prolongado de tratamientos fitosanitarios que son potencialmente peligrosos para la salud humana y el ecosistema [95]. La acumulación de plaguicidas en el cuerpo humano a través del consumo de alimentos plantea riesgos para la salud, de ahí que la detección cuantitativa de agroquímicos en productos alimentarios se ha vuelto de vital importancia [96]. La espectroscopia SERS es una técnica promisoría para la detección de trazas de residuos de agroquímicos presentes en los alimentos, frutas y verduras, ya que es un método rápido, no destructivo, específico y con la posibilidad de realizar medidas *in situ* con el empleo de sustratos flexibles. En este contexto, se han desarrollado distintos sustratos plasmónico, con nanopartículas de diferentes formas (varillas, cubos, estrellas, entre otras) para la detección de plaguicidas, con muy buenos rendimientos para la detección de contaminantes en alimentos [97,98]. Es en este contexto que se ha estudiado en la presente Tesis la detección de trazas de pesticidas seleccionados en cáscaras de frutas y vegetales.

2.7.Referencias

- [1] Le Ru, E. C. y Etchegoin, P. G.; *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, Elsevier, Amsterdam, **2009**.
- [2] Aroca R.; *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester,UK, **2006**.
- [3] Langer, J.; de Aberasturi, D. J.; Aizpurua, J.; Alvarez-Puebla, R. A.; Auguié, B.; Baumberg, J. J.; Bazan, G. C.; Bell, S. E. J.; Boisen, A.; Brolo, A. G.; Choo, J.; Cialla-May, D.; Deckert, V.; Fabris, L.; Faulds, K.; Javier García de Abajo, F.; Goodacre, R.; Graham, D.; Haes, A. J.; Haynes, C. L.; Huck, C.; Itoh, T.; Käll, M.; Kneipp, J.; Kotov, N. A.; Kuang, H.; Le Ru, E. C.; Lee, H. K.; Li, J. F.; Ling, X. Y.; Maier, S. A.; Mayerhöfer, T.; Moskovits, M.; Murakoshi, K.; Nam, J. M.; Nie, S.; Ozaki, Y.; Pastoriza-Santos, I.; Perez-Juste, J.; Popp, J.; Pucci, A.; Reich, S.; Ren, B.; Schatz, G. C.; Shegai, T.; Schlücker, S.; Tay, L. L.; George Thomas, K.; Tian, Z. Q.; van Duyne, R. P.; Vo-Dinh, T.; Wang, Y.; Willets, K. A.; Xu, C.; Xu, H.; Xu, Y.; Yamamoto, Y. S.; Zhao, B.; y Liz-Marzán, L. M. *ACS Nano*. **2019**, 14,1, 28-117.
- [4] Pilot, R.; Signorini, R.; Durante, C.; Orian, L.; Bhamidipati, M.; y Fabris, L. *Biosensors*. **2019**, 9, 57.
- [5] Eberhardt, K.; Stiebing, C.; Matthaüs, C.; Schmitt, M.; y Popp, J. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, 15, 773–787.
- [6] Kneipp, J.; Kneipp, H.; y Kneipp, K. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37 (5), 1052–1060.
- [7] Etchegoin, P.G. y Le Ru, E.C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, 10, 6079–6089.
- [8] Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; y McQuillan, A. J. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 26 (2), 163–166.
- [9] Jeanmaire, D.L. y Van Duyne, R.P. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**, 84, 1–20.
- [10] Albrecht, M.G. y Creighton, J.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 5215–5217.
- [11] Moskovits, M. *J. Chem. Phys.* **1978**, 69, 4159–4161.
- [12] Moskovits, M. *Rev. Mod. Phys.* **1985**, 57, 783.
- [13] Pilot, R.; Signorini, R.; y Fabris, L. *In Metal Nanoparticles and Clusters: Advances in Synthesis, Properties and Applications*; Deepak, F.L., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, **2018**; pp. 89–164
- [14] Moskovits, M. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 485.

-
- [15] Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; y Schatz, G. C. *J. Phys. Chem. B.* **2003**, 107 (3), 668–677
- [16] Sharma, B.; Frontiera, R.R.; Henry, A.-I.; Ringe, E.; y Van Duyne, R.P. *Mater. Today.* **2012**, 15, 16–25.
- [17] Murray, C. A. y Allara, D. L. *J. Chem.Phys.* **1982**, 76, 1290–1303.
- [18] Moskovits, M. y Suh, J. S. *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 6327.
- [19] Weitz, D. A.; Lin, M.Y. y Sandroff, C.J. *Surf. Sci.* **1985**, 158, 147–164.
- [20] Stockman, M. I.; Shalaev, V.M.; Moskovits, M.; Botet, R. y George, T. F. *Phys. Rev. B.* **2002**, 46, 2821–2830.
- [21] Shalaev, V. M.;Markel, V. A.; Poliakov, E. Y. y Armstrong, R. L. *J. Nonlinear Opt. Phys. Mater.* **1998**, 7,131-152.
- [22] Yang, Y.; Creedon, N.; O’Riordan, A.; Lovera, P. *Photonic.* **2021**, 8, 568.
- [23] Ding, S.-Y.; You, E.-M.; Tian, Z.-Q.; y Moskovits, M. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4042–4076.
- [24] Ding, S.-Y.; Yi, J.; Li, J.-F.; Ren, B.; Wu, D.-Y.; Panneerselvam, R.; y Tian, Z.-Q. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, 1, 16021.
- [25] Moskovits, M. *J. Chem. Phys.* **1982**, 77, 4408.
- [26] Moskovits, M. y Suh, J. S. *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 5526.
- [27] Creighton, J. A. *Surf. Sci.* **1983**, 124, 209–219.
- [28] Creighton, J. A. *Surf. Sci.* **1985**, 158, 211–221.
- [29] Otto, A. *J.Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 497.
- [30] Otto, A.; Mrozek, I.; Grabhorn, H. y Akemann, W. *J. Phys.Condens. Matter.* **1992**, 4, 1143–1212.
- [31] Picone, A. L.; Rizzato, M. L.; Lusi, A. R. y Romano, R. M. *Food Chem.*, 2021, 131570.
- [32] Guerrini, L.; Jurasekova, Z;Domingo, C.; Pérez-Méndez, M.;Leyton, P.; Campos-Vallette, M.;Garcia-Ramos, J. V. y Sanchez-Cortes, S. *Plasmonics.* **2007**,147–156.
- [33] Arenas, J. F.; Soto, J.; Tocon, I. L.; Fernandez, D. J.; Otero, J. C. y Marcos, J. I. *J. Chem.Phys.* **2002**, 116, 7207.

-
- [34] Jurasekova, Z.; Garcia-Ramos, J. V.; Domingo, C. y Sanchez-Cortes, S. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, 37, 1239.
- [35] Rubim, J. C.; Corio, P.; Ribeiro, M. C. C. y Matz, M. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 15765.
- [36] Campion, A. y Kambhampati, P. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 241.
- [37] Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; Lu, T. y Xu, J. *J. Chem. Phys.* **1986**, 84, 4174–4180.
- [38] Tuschel, D. *Spectroscopy.* **2016**, 31, 14–23.
- [39] Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer: New York, NY, USA, **2006**.
- [40] Dulkeith, E.; Morteani, A. C.; Niedereichholz, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Levi, S. A.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; Möller, M.; y Gittins, D. I. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 89, 203002.
- [41] Brown, R. J. C. y Milton, M. J. T. *J. Raman Spectrosc.* **2008**, 39, 1313–1326.
- [42] Bonifacio, A.; Cervo, S. y Sergo, V. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 8265–8277.
- [43] Pilot, R. *J. Raman Spectrosc.* **2018**, 49, 954–981.
- [44] Lee, P. C. y Meisel, D. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 3391–3395.
- [45] Isanova, O. S. y Zamborini, F. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 70–72.
- [46] de Oliveira, P. F. M.; Michalchuk, A. A. L.; Marquardt, J.; Feiler, T.; Prinz, C.; Torresi, R. M.; Camargo, P. H. C. y Emmerling, F. *CrystEngComm.* **2020**, 22, 6261–6267.
- [47] Amendola, V.; Pilot, R.; Frascioni, M.; Maragò, O. M. y Iatì, M. A. *J. Phys. Condens. Matter.* **2017**, 29, 203002.
- [48] Pamies, R.; Cifre, J. G. H.; Espín, V. F.; Collado-González, M.; Baños, F. G. D. y De La Torre, J. G. *J. Nanopart. Res.* **2014**, 16, 2376.
- [49] Tantra, R.; Brown, R. J. C. y Milton, M. J. T. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, 38, 1469–1479.
- [50] Meyer, M.; Le Ru, E. C. y Etchegoin, P. G. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 6040–6047.
- [51] Guerrini, L. y Graham, D. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 7085–7107.
- [52] Giallongo, G.; Pilot, R.; Durante, C.; Rizzi, G. A.; Signorini, R.; Bozio, R.; Gennaro, A. y Granozzi, G. *Plasmonics.* **2011**, 6, 725–733.

[53] Durante, C.; Perazzolo, V.; Isse, A. A.; Favaro, M.; Granozzi, G. y Gennaro, A. *Chem ElectroChem.* **2014**, 1, 1370–1381.

[54] Oklejas, V. y Harris, J. M. *Appl. Spectrosc.* **2004**, 58, 945.

[55] Acres, R. G.; Ellis, A. V.; Alvino, J.; Lenahan, C. E.; Khodakov, D. A.; Metha, G. F. y Andersson, G. G. *J. Phys. Chem.C.* **2012**, 116, 6289–6297.

[56] Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B. y Natan, M. J. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 735–743.

[57] Freeman, R. G.; Grabar, K. C.; Allison, K. J.; Bright, R. M.; Davis, J. A.; Guthrie, A. P.; Hommer, M. B.; Jackson, M. A.; Smith, P. C.; Walter, D. G. y Natan, M. J. *Science.* **1995**, 267, 1629–1632.

[58] Grabar, K. C.; Smith, P. C.; Musick, M. D.; Davis, J. A.; Walter, D. G.; Jackson, M. A.; Guthrie, A. P. y Natan, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1148–1153.

[59] Fan, M.; Andrade, G. F. S. y Brolo, A. G. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, 693, 7–25.

[60] Toderas, F.; Baia, M.; Baia, L. y Astilean, S. *Nanotechnology.* **2007**, 18, 255702.

[61] Xu, K.; Zhou, R.; Takei, K. y Hong, M. *Adv. Sci.* **2019**, 1900925, 1–23.

[62] Zhang, D.; Pu, H.; Huang, L., y Sun, D.-W. *Trends Food Sci Technol.* **2021**, 109, 690–701.

[63] Aldeanueva-Potel, P.; Faoucher, E.; Alvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzan, L. M. y Brust, M. *Anal. Chem.* **2009**, 81(22), 9233–9238.

[64] He, L.; Chen, T. y Bu Laza, T.P. *Food Chem.* **2014**, 148, 42-46.

[65] Hu, B.; Sun, D-W.; Pu, H. y Wei, Q. *Talanta.* **2020**, 120998.

[66] Oliveira, M. J.; Quaresma, P.; De Almeida, M. P.; Araújo, A.; Pereira, E.; Fortunato, E.; Martins, R.; Franco, R. y Águas, H. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1–14.

[67] Ngo, Y.H.; Li, D.; Simon, G. P. y Garnier, G. *Langmuir* **2012**, 28, 8782–8790.

[68] Yu, W. W. y White, I. M. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 9626–9630.

[69] Lee, M. R.; Lee, H. K.; Yang, Y.; Koh, C. S. L.; Lay, C. L.; Lee, Y. H.; Phang, I. Y. y Ling, X. Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2017**, 9, 39584–39593.

[70] Xu, B.-B.; Ma, Z.-C.; Wang, L.; Zhang, R.; Niu, L.-G.; Yang, Z.; Zhang, Y.-L.; Zheng, W.-H.; Zhao, B.; Xu, Y.; Chen, Q. D.; Xia, H. y Sun, H.-B. *Lab Chip.* **2011**, 11, 3347–3351.

-
- [71] Xu, B. B.; Ma, Z. C.; Wang, L.; Zhang, R.; Niu, L. G.; Yang, Z.; Zhang, Y. L.; Zheng, W.-H.; Zhao, B.; Xu, Y.; Chen, Q. D.; Xia, H. y Sun, H. B. *Lab Chip*. **2011**, *11*, 3347–3351.
- [72] Walcarius, A.; Sibottier, E.; Etienne, M. y Ghanbaja, J. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 602–608.
- [73] Masuda, H. y Fukuda, K. *Science* **1995**, *268*, 1466–1468.
- [74] Volgin, V. M.; Lyubimov, V. V.; Gnidina, I. V. y Davydov, A. D. *Procedia CIRP*. **2015**, *37*, 89–94
- [75] Wang, H. H.; Liu, C. Y.; Wu, S. Bin; Liu, N. W.; Peng, C. Y.; Chan, T. H.; Hsu, C. F.; Wang, J. K. y Wang, Y. L. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 491–495.
- [76] Giallongo, G.; Durante, C.; Pilot, R.; Garoli, D.; Bozio, R.; Romanato, F.; Gennaro, A.; Rizzi, G. A. y Granozzi, G. *Nanotechnology*. **2012**, *23*, 325604.
- [77] Stewart, M.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A. y Nuzzo, R. G. *Chem. Rev.* **2008**, 494–521.
- [78] Forestiere, C.; Pasquale, A. J.; Capretti, A.; Miano, G.; Tamburrino, A.; Lee, S. Y.; Reinhard, B. M. y Dal Negro, L. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 2037–2044.
- [79] Ahamed, M.; Karns, M.; Goodson, M.; Rowe, J.; Hussain, S. M.; Schlager, J. J. y Hong, Y. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *233*, 404–410.
- [80] Lane, L. A.; Qian, X. y Nie, S. *SERS. Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10489–10529.
- [81] Mulvaney, S. P.; Musick, M. D.; Keating, C. D. y Natan, M. J. *Langmuir*. **2003**, *19*, 4784–4790.
- [82] Qian, X.; Peng, X.-H.; Ansari, D. O.; Yin-Goen, Q.; Chen, G. Z.; Shin, D. M.; Yang, L.; Young, A. N.; Wang, M. D.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 83–90.
- [83] Ocean Insight: <https://www.oceaninsight.com/products/sampling-accessories/raman/sers/sers/>. Consultado en noviembre 2022.
- [84] Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R. y El-Sayed, M. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1025–1102.
- [85] Stuart, D. A.; Biggs, K. B. y Van Duyne, R. P. *Analyst*. **2006**, *131*, 568.
- [86] Zheng, X. S.; Jahn, I. J.; Weber, K.; Cialla-May, D. y Popp, J. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *197*, 56–77.
- [87] Fikiet, M. A.; Khandasammy, S. R.; Mistek, E.; Ahmed, Y.; Halámková, L.; Bueno, J. y Lednev, I. K. *Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *197*, 255–260.

-
- [88] Picone, A. L.; Carlos O. Della Védova, C. O. y Romano, M. R. *Vib. Spectrosc.* **2020**, 110, 103136.
- [89] Casadio, F.; Leona, M.; Lombardi, J. R. y Van Duyne, R. P. *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 782–791.
- [90] Xu, J. Y.; Wang, J.; Kong, L. T.; Zheng, G.C.; Guo, Z. y Liu, J. H. *J. Raman Spectrosc.* **2011**, 42, 1728–1735.
- [91] Li, D.W.; Zhai, W. L.; Li, Y. T. y Long, Y. T. *Microchim. Acta.* **2014**, 181, 23–43.
- [92] Mosier-Boss, P. A. y Lieberman, S. H. *Appl. Spectrosc.* **2003**, 57, 1129–1137.
- [93] Azimi, S. y Docoslis, A. *Sensor.* **2022**, 22, 3877.
- [94] Yu, B.; Ge, M.; Li, P.; Xie, Q. y Yang, L. *Talanta.* **2019**, 191, 1-10.
- [95] Fenik, J., Tankiewicz, M., y Biziuk, M. *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30(6), 814–826.
- [96] Xu, Y.; Kutsanedzie, F. Y. H.; Hassan, M. M.; Zhu, J.; Li, H. y Chen, Q. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, 324, 128718.
- [97] Pang, S.; Yang, T. y He, L. *Trends Anal. Chem.* **2016**, 85, 73–82.
- [98] Xu, M.; Gao, Y.; Han, X. X. y Zhao, B. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 6719–6726.

CAPÍTULO 3

AGROQUÍMICOS

En la actualidad, los agroquímicos son de gran importancia en el modelo agrícola y existen diferentes denominaciones para hacer referencia a los mismos como: plaguicidas, pesticidas, agrotóxicos, agroquímicos y productos fitosanitarios.

Según la definición de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (del inglés, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) [1], un *plaguicida* “es cualquier sustancia o mezcla de sustancias, natural o de síntesis química, destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga entre las que se encuentran; vectores de enfermedades, especies indeseadas para plantas o animales que causan daño o que interfieren de alguna forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, es decir en la cadena de producción”. Dentro de esta definición se incluyen reguladores de crecimientos, defoliantes, desecantes, productos empleados para reducir la densidad de las frutas o para evitar la caída prematura de las mismas, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger al producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término excluye los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios y medicamentos para animales. Del mismo modo, la FAO define como *residuos de plaguicidas* “aquellas sustancias presentes en los alimentos, productos agrícolas o pienso para animales, así como en el medio ambiente, como consecuencia del empleo de un plaguicida”. Adicionalmente, el término engloba cualquier derivado, ya sea como productos de conversión o reacción, metabolitos e impurezas de importancia toxicológica.

Como se mencionó, cuando se emplean productos fitosanitarios en los cultivos, cantidades de éstos pueden absorberse o quedar en la superficie de los alimentos como residuos de plaguicidas; es por ello, que existen entes reguladores a nivel nacional e internacional para su control, siempre adaptándose a niveles no tóxicos para su consumo. El *Codex Alimentarius*¹, es el organismo que establece los *límites máximos de residuos* (LMR) de plaguicidas que se permiten legalmente en alimentos, productos agrícolas y piensos cuando los plaguicidas se aplican correctamente

¹ Organismo internacional creado por la FAO y OMS (Organización Mundial de la Salud), para la elaboración de normas, códigos de prácticas, directrices y recomendaciones sobre la inocuidad de los alimentos, cuya finalidad es la protección de la salud de los consumidores.

conforme a las buenas prácticas agrícolas (BPA)². Por lo tanto, el LMR es la concentración máxima de residuos de un plaguicida o contaminante que la *Comisión del Codex Alimentarius* recomienda que se permita legalmente o se reconozca como aceptable en o sobre un alimento, producto agrícola o alimento para animales. El mismo se expresa en mg de residuo por kg de producto o lo que es lo mismo, partes por millón (ppm). Cabe destacar que, así como existen LMR recomendados por *Codex*, también los distintos países como es el caso de Argentina, establecen sus propios límites máximos de residuo. En ese sentido, se debe tener en cuenta que el LMR es un parámetro fijado por entes que velan por la producción, y no es un parámetro toxicológico, aunque siempre respeta los límites de riesgo toxicológicos.

Desde su creación, los plaguicidas han sido empleados en múltiples y variados contextos, lo que explica su ubicuidad. Aunque la agricultura es la actividad que más emplea agroquímicos (85 % de la producción mundial) [2] con el fin de controlar plagas que causan la pérdida de la calidad de los productos, su deterioro o disminución en las cosechas de alimentos, una gran parte de la producción total de productos sanitarios está destinada a las actividades de salud pública, para el control de enfermedades transmitidas por vectores como la malaria, enfermedad de Chagas, dengue, entre otras. Además, es también empleada para el control de roedores, para evitar la proliferación de hongos, algas y bacterias en grandes reservorios de agua, como también para eliminación de cultivos ilegales. A pesar de las numerosas aplicaciones beneficiosas de los plaguicidas sobre la calidad de vida, se debe tener en cuenta que muchos de ellos pueden tener graves consecuencias sobre la salud de los seres humanos así también como en el medio ambiente. En Argentina el rubro agrícola es uno de los principales pilares o contribuyentes a la economía nacional y debido a ello, el empleo de plaguicidas se ha incrementado enormemente en las últimas décadas como se puede observar en la **Figura 3.1**.

² Prácticas oficialmente autorizadas en el uso de un plaguicida para efectuar un control efectivo y confiable de plagas en cualquier estadio de la producción; el mismo tiene en cuenta la salud humana y el medio ambiente.

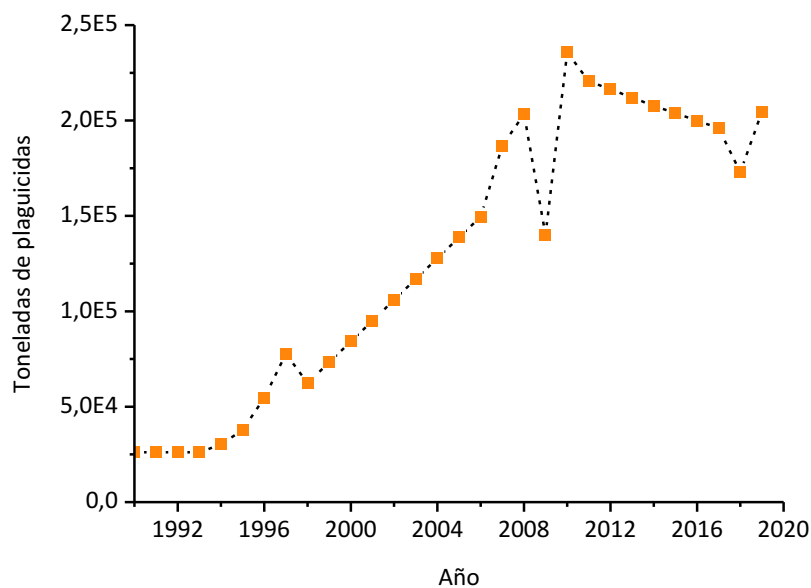


Figura 3.1.: Cantidad (toneladas) de plaguicidas totales empleado en las últimas décadas en Argentina. Fuente: FAOSTAT [3]: 22-03-2022

3.2. Clasificación

Los agroquímicos pueden clasificarse de diferentes formas según sus características principales. Entre ellas las más empleadas son, según el/los organismos blancos como: herbicidas, insecticidas, fungicidas; y por la estructura química o grupo activos como: compuestos clorados, organofosforados, carbamatos, benzimidazoles, entre otros. Adicionalmente, se clasifican según su modo de acción, según su toxicidad, su comportamiento cuando se encuentra en contacto con las plantas o blancos (sistémicos o por contacto), especificidad contra la plaga (selectivos o no), etc.

Cabe destacar que los plaguicidas sistémicos son aquellos que son absorbidos por el tejido vegetal donde luego es transportado hacia otras partes de la planta, mientras que los plaguicidas por contacto o no sistémicos no son capaces de penetrar el tejido y solamente son efectivos cuando entra en contacto directo con la plaga [4,5]. De este modo, según el grado de penetración del plaguicida se puede determinar su persistencia luego de los tratamientos poscosechas, como también el grado de eliminación del mismo [6]. A continuación se presenta una clasificación de los

plaguicidas pertenecientes al grupo de los fungicidas según su estructura química (Tabla 3.1.).

Tabla 3.1. Clasificación general de los fungicidas según su estructura química

Fungicidas según su estructura química	Estructura molecular	Ejemplo del principio activo
Inorgánicos	Sal de cobre	Oxicloruro de cobre, óxido cuproso, sulfato de cobre pentahidratado
	Azufre	Azufre
Organometal	Órgano estaño	Trifenil acetato de estaño
	Sal de zinc	Naftenato de zinc
Amidas/ Imidas	Amida	Benzovindiflupir
	Benzamida	Fluopicolide, zoxamide
	Carboxamida/ Anilida/ Pirazol	Boscalid, fenhexamida, sedaxane, fluxapiroxad, pidiflumetofen, isopirazam
	Fenilamida	Metalaxil, furalaxil
	Mandelamida	Mandipropamida
	Dicarboximidas	Famoxadona, iprodiona, procimidona
	Cianoacetamida oxima	Cimoxanil
	Tioftalimida	Captan, folpet
Azoles	Triazol	Difenoconazol, protioconazol
	Imidazol	Ciazofamida, imazalil, procloraz
	Benzimidazol	Carbendazim, tiabendazol, benomil, metil tiofanato
	Tiazol	Etaboxam
	Triazolintiona	Protioconazol
Estrobinas	Estrobilurina	Dimoxistrobin, fluoxastrobin
Carbamatos	Ditiocarbamato	Tiram, propineb, ziram, ferbam
	Carbamato	Iprovalicarb, propamocarb clorhidrato
Fenoles	Dinitrofenol	Meptildinocap
	Fenol	Ortofenilfenato de sodio
Pirimidinas	Pirimidina	Bupirimato, ciprodinil, fenarimol, pirimetanil
	Triazolpirimidina	Ametoctradin

En el presente trabajo de tesis se emplearon tres fungicidas, pertenecientes a las familias de los ditiocarbamatos y benzimidazoles, para el desarrollo de métodos que permitan la detección de sus residuos en cáscaras de frutas y verduras. Por esta razón, se hará referencia a continuación sobre los plaguicidas utilizados.

3.2.1. Tiram

El tiram (**Figura 3.2.**) es un fungicida perteneciente a la familia de los ditiocarbamatos según la clasificación de grupos funcionales activos antes mencionado. El mismo, es un compuesto muy empleado de acción preventiva y de amplio espectro en semillas y hojas en los campos de diferentes cultivos (césped, vegetales y frutas) frente a enfermedades causadas por hongos. Adicionalmente, es utilizado como repelente para la protección de frutas y árboles frente a roedores [7].

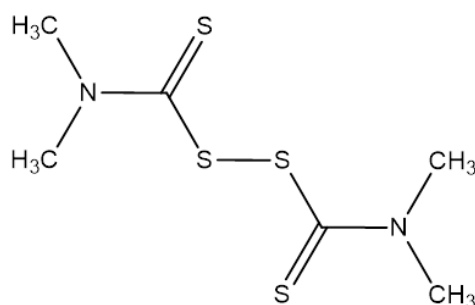


Figura 3.2.: Estructura molecular del fungicida tiram.

El efecto fungicida del tiram se relaciona con la capacidad de éste de formar complejos con los iones de los metales pesados, frecuentemente presentes en enzimas y coenzimas de las células fúngicas, provocando el bloqueo de las actividades catalítica de las mismas. A bajas concentraciones de tiram, actúa sobre los sistemas enzimáticos impidiendo la germinación de esporas [7,8]. Durante su descomposición enzimática se producen metabolitos intermediarios como por ejemplo, disulfuro de carbono (CS₂), tiourea, alquilaminas, etilenaminas entre otros productos de la biotransformación. Se ha determinado que los efectos tóxicos del tiram, y en general de todos los fungicidas ditiocarbamatos, se deben a los productos de degradación como CS₂ o etilentiourea, ya que los mismos suelen presentar propiedades cancerígenas [9,10]. El empleo de este fungicida puede causar grandes daños sobre el medio ambiente como también en

los seres vivos cuando no se manipula o almacena adecuadamente. Por otra parte, el tiram es también un producto de degradación ambiental de otros dos fungicidas, ferbam y ziram. Según su modo de acción, pertenece al grupo de fungicida de contacto o no sistémico, de baja toxicidad que puede provocar irritación de la piel y de las membranas mucosas, y su exposición crónica puede provocar cáncer o aumentar su incidencia.

3.2.2. Tiabendazol

El tiabendazol (TBZ) es un fungicida que pertenece al grupo de los compuestos benzimidazoles conforme a la clasificación de grupos funcionales. El TBZ, está formado por una porción benzimidazol y otra tiazol como se observa en la **Figura 3.3**.

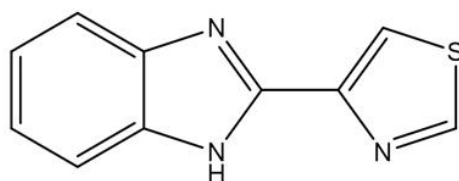


Figura 3.3. Estructura molecular del tiabendazol (TBZ).

Este fungicida es aplicado comúnmente en tratamientos pre y poscosecha en varios cultivos, principalmente para prevenir el desarrollo de mohos/hongos durante el transporte y almacenamiento de productos agrarios (tratamiento de semillas, frutas y verduras) [11]. Asimismo, tiene propiedades farmacológicas en cuanto al control de helmintos³ en especies animales. El TBZ está clasificado como de baja toxicidad para los seres humanos, sin embargo, a grandes exposiciones del fungicida puede ser cancerígeno y causar desequilibrios hormonales, siendo además muy tóxico a largo plazo principalmente en medioambientes acuáticos [12,13]. El efecto fungicida del TBZ está asociado a la interferencia en la mitosis y en el movimiento nuclear de la célula fúngica. Esta acción ocasiona la desorganización de la estructura y con ello paraliza el crecimiento de la célula fúngica. A diferencia del tiram, el tiabendazol pertenece al

³ Gusano de cuerpo largo o blando que infectan el organismo de otras especies.

grupo de fungicidas sistémicos, es decir, posee la propiedad o capacidad de penetrar rápidamente en el interior de las plantas dificultando la remoción de los mismo de las superficies de frutas y vegetales [14,15].

3.2.3. Carbendazim

El carbendazim (CBZ) (**Figura 3.4.**) es un fungicida de amplio espectro, empleado extensamente en la agricultura por su alta eficiencia y debido además a que es relativamente económico. El CBZ es utilizado para el control de hongos patógenos y moho por tratamiento de semillas y fumigaciones poscosecha de frutas, vegetales y alimentos en general. Adicionalmente, el CBZ es un producto de degradación de benomilo y tiofanatometil, que también son fungicidas comúnmente utilizados en agricultura [16].

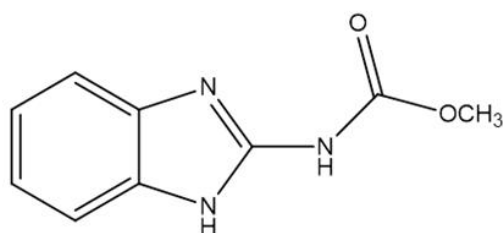


Figura 3.4. Estructura molecular del carbendazim.

El efecto fungicida del CBZ se basa fundamentalmente en la inhibición de la polimerización o ensamblaje de los microtúbulos en las células, al reaccionar con la enzima responsable de la misma, causando alteraciones en la segregación de los cromosomas durante la división celular. El CBZ no es catalogado como un fungicida selectivo, de modo que ocasiona muchos efectos nocivos sobre los seres humanos. De hecho, se conocen enfermedades desarrolladas a causa de este fungicida como ser: cáncer, embriotoxicidad, apoptosis de células germinales, teratogénesis, infertilidad, entre otras enfermedades desarrolladas en diferentes especies debido a la toxicidad de este fungicida [16].

3.3. Problemas derivados del uso inadecuado de agroquímicos

En los últimos años, la creciente demanda de alimentos provocó el uso excesivo e inadecuado de productos fitosanitarios por parte de grandes agricultores para cubrir los requerimientos asociados con la producción de alimentos. En la mayoría de los casos los agroquímicos presentan propiedades tóxicas, muchas veces persistentes y bioacumulativas con efectos negativos no solo para las especies para las que fueron diseñadas (especies blanco o diana), sino también sobre otros seres vivos y el ecosistema [17]. Cabe señalar que los productos fitosanitarios no son contaminantes únicamente en la etapa de producción, sino también durante el almacenamiento y transporte. Por esta razón, la determinación de residuos de plaguicidas tiene un rol fundamental en la prevención de la salud, ya que nos encontramos continuamente expuestos a diversos agroquímicos, y una de estas fuentes de contaminantes es debida a la ingesta diaria de alimentos con residuos de plaguicidas [18].

Algunos de los problemas desarrollados, de modo general, por el uso inadecuado o incorrecto de agroquímicos son principalmente [19,20]:

- Riesgo para la salud humana debido a la exposición continua a productos fitosanitarios tóxicos, ya sea por actividades laborales, accidentales, y por exposición ambiental, lo que conlleva al incremento de casos de intoxicaciones.
- Desequilibrio del medio natural; el uso inadecuado de plaguicidas provoca la muerte o desaparición de enemigos naturales que permiten mantener las poblaciones de las plagas en niveles que no causan daños económicos. Adicionalmente, provoca la reaparición de plagas nuevas y cada vez más resistentes.
- Desarrollo de resistencia; el empleo continuo y prolongado de agroquímicos conduce al desarrollo de resistencia de las plagas para las que fueron desarrolladas los plaguicidas y además, en muchos casos producen resistencias cruzadas debido a la baja selectividad de algunos agroquímicos hacia la diana o blanco. En muchas ocasiones se generan resistencias múltiples a un gran número de plaguicidas. Como resultado, esto conduce a la necesidad de mayores dosis para el control de plagas debido a su resistencia, así como también una mayor frecuencia en las aplicaciones de los plaguicidas.

➤ Contaminación ambiental; como es evidente, el empleo de agroquímicos causa efectos adversos sobre el medio ambiente (ecosistemas acuáticos y terrestres, microorganismos, etc.) ya sea por el descarte incorrecto de envases, falta de mantenimiento y capacitaciones constantes al personal, ocasionando la acumulación de residuos tóxicos.

Como se mencionó anteriormente, el uso inadecuado de los productos fitosanitarios ya sea por desconocimiento o por falta de personal calificado, genera grandes efectos peligrosos sobre los seres humanos y el ambiente. Por esta razón, las organizaciones reguladoras (*Codex Alimentarius*, FAO) establecen recomendaciones como, por ejemplo, los límites máximos de residuos de plaguicidas y el uso responsable de productos fitosanitarios antes, durante y con posterioridad a la aplicación de los mismos para cuidar y conservar tanto la salud como el medio ambiente [21].

3.4. Regulación en el uso de agroquímicos

Como se mencionó al inicio de este capítulo, el *Codex Alimentarius* [22] es el organismo responsable de establecer y recomendar los LMR de plaguicidas. Los mismos, se basan fundamentalmente en los datos obtenidos de BPA y tienen el objetivo de conseguir que los productos agrícolas y sus derivados se ajusten y sean aceptables para su consumo. Los LMR de plaguicidas recomendados por el *Codex* se aplican fundamentalmente a productos destinados al comercio internacional y se obtienen teniendo en cuenta los estudios y estimaciones realizadas por la JMPR (del inglés, *Joint FAO/WHO Meetings on Pesticides Residues*) luego de la evaluación toxicológica del plaguicida, su residuo y su examen en usos previstos ajustándose siempre a las BPA nacionales y a la inocuidad alimentaria [23]. El examen de dichas estimaciones y determinaciones, tanto a nivel nacional como internacional, teniendo en cuenta la ingesta de residuos a través de la alimentación y sus parámetros como la IDA⁴, permite que los alimentos que se ajustan a los LMR del *Codex* sean inocuos para

⁴ IDA: ingesta diaria admisible, es una estimación de la cantidad de una sustancia presente en los alimentos o el agua potable que puede consumirse diariamente durante toda la vida sin que se aprecie un riesgo sobre la salud.

el consumo humano. De este modo, organizaciones de distintos países fijan sus propios LMR o tolerancias de residuos permitidos de plaguicidas teniendo en cuenta los LMR de plaguicidas recomendados por *Codex Alimentarius* y velan por su cumplimiento.

En Argentina, el organismo responsable del registro y establecimiento de los LMR de los agroquímicos y su combinación con distintos alimentos es el SENASA [24] (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). Asimismo, también existe la normativa del MERCOSUR [25] (Mercado Común del Sur) que especifica mediante la resolución N° 74/1994, los LMR de plaguicidas de determinados cultivos. En lo que respecta a las regulaciones internacionales, en los Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, del inglés, *U.S. Environmental Protection Agency*) [26], es el organismo encargado de autorizar y fijar los LMR o tolerancias de plaguicidas, mientras que a nivel europeo se encuentra la Comisión Europea [27] para regular y controlar los residuos de plaguicidas en alimentos.

La legislación Argentina, conforme al SENASA en su última actualización, resolución N° 934/2010 [24], establece los LMR de plaguicidas en productos agropecuarios comercializados. En el mismo se detalla las concentraciones máximas permitidas de tiram en frutas y verduras; para el tomate y la frutilla es de 3 mg/kg, para la manzana de 2 mg/kg y en el caso de la cereza es de 1 mg/kg. Del mismo modo, organismos de regulación internacionales como la EPA, fija el LMR para este fungicida en la manzana y frutillas en un valor de 7 mg/kg [26], en tanto que los límites de tolerancia del tiram conforme a la Comisión de la Unión Europea [27] dependen del tipo de fruta o vegetal; así por ejemplo, para el caso de las manzanas o peras el mismo es de 5 mg/kg, mientras que en frutillas es de 10 mg/kg y en morrón es de 0,1 mg/kg.

En lo que respecta a los límites máximos de residuos establecidos para el tiabendazol, en Argentina [24] varían según el cultivo y en muchos casos también depende de si los mismos son empleados en tratamientos previos o posteriores a la cosecha; para el caso de las manzanas o peras su valor es de 3 mg/kg tanto en tratamientos pre o poscosecha. Del mismo modo, los organismos gubernamentales internacionales, establecen los valores máximos permitidos para el TBZ según el alimento; en este aspecto la Comisión de la Unión Europea [27] tiene un valor máximo

de residuo de TBZ para la manzana de 4 mg/kg, mientras que la EPA [26] establece su valor máximo en 12 mg/kg.

Por último, debido a los efectos negativos que provoca el empleo del carbendazim en la salud humana, se ha incrementado las restricciones sobre su uso en varios países, y los límites de residuos máximos de este plaguicida se han reducido bruscamente en los últimos años. En efecto, en varios países como por ejemplo, Australia se ha prohibido su uso, mientras que la Comisión de la Unión Europea disminuyó significativamente los valores de los límites máximos de residuos de CBZ permitidos para frutas y vegetales, dentro del rango de 0,2 a 0,7 mg/kg [27]. Sin embargo, en Argentina, los LMR de este fungicida varían según el alimento, de modo que para la manzana y el tomate es de 1 mg/kg; en la frutilla de 2 mg/kg; y en la berenjena y el morrón son 0,5 y 0,1 mg/kg, respectivamente [24]. En la siguiente tabla se muestran de manera resumida los distintos LMR establecidos por los entes nacionales e internacionales para los distintos plaguicidas en estudio en este trabajo **(Tabla 3.2.)**.

Tabla 3.2.: Resumen de los límites máximos de residuos para los plaguicidas seleccionados.

Agroquímicos	Fruta o vegetal	SENASA (mg/Kg)	EPA (mg/Kg)	Unión Europea (mg/Kg)
Tiram	Manzana	2	7	5
	Morrón	Exento	-	0,1
	Frutilla	3	7	10
	Tomate	3	-	-
	Berenjena	Exento	-	-
	Cereza	1	-	-
Tiabendazol	Manzana/ Pera	3	12	4
	Morrón Verde	-	-	0,01
	Tomate	-	-	0,01
	Berenjena	-	-	0,01
	Frutilla	-	5	0,05
Carbendazim	Manzana/ Pera	1	1	0,2
	Morrón Verde	0,1	0,1	0,1
	Tomate	1	1	0,3
	Berenjena	0,5	-	-
	Frutilla	2	2	0,1

3.5. Metodologías para la detección de residuos de agroquímicos en alimentos

Actualmente, técnicas cromatográficas como cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masa (LC-MS) y cromatografía gaseosa junto a espectrometría de masas (GC-MS) son usualmente empleados para la detección sensible de residuos de plaguicidas en diferentes matrices de productos alimentarios [28,29]. Sin embargo, aunque estas técnicas muestran buena precisión, presentan el inconveniente de ser metodologías de elevados costos, destructivas, que demandan mucho tiempo ya que requieren tratamientos y acondicionamientos previos de las muestras (proceso de extracción, purificación, etc.) lo que conlleva inevitablemente a personal calificado en la materia y tiempo. En los últimos años, han surgido métodos para la detección y cuantificación de residuos de agroquímicos basados en la espectroscopia SERS, los cuales son prometedores ya que presentan varias ventajas frente a las técnicas habitualmente utilizadas en cromatografía, como por ejemplo, detección *in situ*, no destructiva, sin tratamientos previos y rapidez en el análisis [30,31,32,33]. Adicionalmente, la técnica de espectroscopia SERS presenta alta sensibilidad, como fue mencionado en el capítulo precedente, permitiendo la detección y cuantificación de residuos de plaguicidas en alimentos. Desde su descubrimiento, el creciente desarrollo de la ciencia de los materiales, la plasmónica, entre otras, permitió la evolución de la espectroscopia SERS, lo que desencadenó el aumento de estudios publicados basados en diferentes estrategias y usos de esta técnica espectroscópica para la detección ultrasensible de contaminantes presentes en los alimentos. En base a las técnicas previamente mencionadas para la detección de residuos de plaguicidas en productos alimenticios, el presente trabajo de Tesis se enfocó en el desarrollo de sustratos SERS flexibles e innovadores de nanopartículas de plata de diferentes formas para el estudio y detección de trazas de residuos de plaguicidas (tiram, TBZ y CBZ) presentes en cáscaras de frutas y vegetales, empleando la espectroscopia SERS.

3.6. Referencias

- [1] Definiciones para los fines del Codex alimentarius. <http://www.fao.org/docrep/W5975S/w5975s08.htm>. Consultado abril del 2022.
- [2] Pórfido, O.D. y Butler, E. *Los plaguicidas en la República Argentina*. Ed. Ministerio de Salud de la Nación, primera edición, Buenos Aires, Argentina, 2013.
- [3] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/statistics/es/>. Consultado en abril del 2022.
- [4] Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. <http://www.casafe.org>. Consultado en abril del 2022.
- [5] Cámara de la Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquímicos. <https://www.ciafa.org.ar/info-fitosanitario>. Consultado en abril del 2022.
- [6] Yang, T.; Zhang, Z.; Zhao, B.; Hou, R.Y.; Kinchla, A.; Clark, J. M. y He, L. *Anal. Chem.* **2016**, 1–23.
- [7] Sharma, V. K.; Aulakh, J. S. y Malik, A. K. *J. Environ. Monit.*, **2003**, 5, 717–723.
- [8] Li, P.; Liu, H.; Yang, L. y Liu, J. *Talanta*. **2013**, 117, 39–44.
- [9] Dalvi, R. R. y Deoras, D. P. *Acta pharmacol. et toxicol.* **1986**, 58, 3842.
- [10] Stoytcheva, M. Pesticides in the Modern World - Effects of Pesticides Exposure. (Ed.). **2011**. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/943>
- [11] Oliveira, M. J.S; Rubira, R. J.G.; Furini, L. N.; Batagin-Neto, A. y Constantino, C. J. L. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, 517, 145786.
- [12] EPA R.E.D. FACTS: Thiabendazole and Salts. https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/thiabendazole_red.pdf. Consultado en abril del 2022.
- [13] Muller, C.; David, L.; Chis, V. y Cinta Pinzaru, S. *Food Chem.* **2014**, 145, 814–820.
- [14] Yang, T.; Doherty, J.; Zhao, B.; Kinchla, A. J.; Clark, J.M. y He, L. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 9744–9752.
- [15] Systemic Fungicides: A Perspective After 10 Years. L. V. Edgington, University of Guelph, Ontario, Canada. R. A. Martin, G. C. Bruin, and I. M. Parsons, University of Guelph, Ontario, Canada. *Plant Dis.* 64:19. Copyright 1980 American Phytopathological Society.
- [16] Wang, S. Y.; Shi, X. C.; Liu, F. Q. y Laborda, P. *J. Agric. Food Chem.* **2020**. 68, 11880–11894.

[17] Shiva, V.; Elver, H.; Alleva, R.; Bernasconi, S.; Bevilacqua, P.; Cavazzoni, L.; Ceccareli, S.; D'hallewin, G.; El-Hage-Scialabba, N.; Falk, R.; Gentinili, P.; Orlando, J.B.; Reddy, S. y Shiva, M. *El veneno continúa llegando al plato: Alimentos y residuos. Análisis y sistematización de los resultados de los controles oficiales del SENASA sobre la presencia de agrotóxicos en frutas, hortalizas, verduras, cereales y oleaginosas entre los años 2017 y 2019, en toda la Argentina*. Naturaleza de Derechos. Febrero **2021**. © 2019 English Edition India by Navdanya/Research Foundation for Science, Technology and Environment. Información & edición Fernando Cabaleiro.

[18] *Aplicación eficiente de fitosanitarios. Capítulo 2: plaguicidas químicos, composición y formulaciones, etiquetado, clasificación toxicológica, residuos y métodos de aplicación*. **2014**. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

[19] Pacheco, M. R. y Barbona, E. I. *Manual de uso seguro y responsable de agroquímicos en cultivos frutihortícolas*. **2017**. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Bella Vista, Corrientes, Argentina.

[20] Villaamil Lepori, E. C; Bovi Mitre, G. y Nassetta, M. *Rev. Int. Contam. Ambie.* **2013**, 29 (Número especial sobre plaguicidas) 25-43.

[21] Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). <https://www.casafe.org/buenas-practicas-agricolas/>. Consultado en abril del 2022.

[22] Codex Alimentarius. Normas internacionales de los alimentos. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>. Consultado en abril del 2022.

[23] Organización mundial de la salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>. Consultado en abril del 2022.

[24] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-934-2010-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>. Consultado en abril del 2022.

[25] MERCOSUR: Resolución GMC N° 23. *Residuos de plaguicidas en productos agrícolas. Mercado Común del Sur. 1994*. <http://www.sice.oas.org/trade/mrcsrs/resolutions/Res2394.asp>. Consultado abril del 2022.

[26] Environmental Protection Agency. <https://www.epa.gov/pesticide-tolerances/pesticide-types-index>. Consultado en abril del 2022.

[27] European Commission. https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/maximum-residue-levels_en. Consultado en abril del 2022.

[28] Manzano-Sánchez, L.; Martínez-Martínez, J. A.; Domínguez, I.; Martínez Vidal, J. L.; Garrido Frenich A. y Romero-González, R. *Foods*. **2020**, *9*, 553.

[29] Xu, Y.; Kutsanedzie, F. Y. H.; Mehedi Hassan, M.; Zhu, J.; Li, H. y Chen, Q. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *324*, 128718.

[30] Zhang, D.; Pu, H.; Huang, L. y Sun, D. W. *Trends Food Sci Technol.* **2021**, *109*, 690–701.

[31] Xu, M-L.; Gao, Y. y Han, X-X. *Foods*. **2022**, *11*, 2097, 1–12.

[32] Liu, C.; Xu, D.; Dong, X.; Huang, Q. *Trends Food Sci Technol* . **2022**, *128*, 90–101.

[33] Nilghaz, A.; Mousavi, S. M.; Amiri, A.; Tian, J.; Cao, R. y Wang, X. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 5463–5476.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo está dirigido en una primera parte a describir brevemente los materiales y reactivos empleado para el desarrollo de esta Tesis. Posteriormente se presentarán las técnicas instrumentales utilizadas a lo largo de este trabajo para la caracterización de nanopartículas de plata, sustratos SERS y para la detección de plaguicidas en cáscaras de frutas y vegetales.

4.2. Reactivos y materiales de laboratorio

Para la síntesis de nanopartículas de plata “esféricas” se empleó nitrato de plata (AgNO_3 99,0%, Cicarelli), citrato trisódico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 99,0 %, Cicarelli), borohidruro de sodio (NaBH_4 , $\geq 98,0$ %, Biopack), y agar (Merck). Para la síntesis de nanoestrellas de plata se empleó adicionalmente como reductor hidroxilamina (NH_2OH 50 % p/v en agua, Sigma-Aldrich) en medio básico (hidróxido de sodio). En ambas síntesis de nanopartículas de plata, así como en todas sus etapas, se utilizó agua mili-Q (17,8 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$). Para la evaluación de los sustratos SERS desarrollados se empleó como molécula sonda o de prueba azul de metileno (MB, del inglés *methylene blue*) [cloruro de 7-(dimetilamino) fenotiazina-3-ilideno]-dimetilazanio ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{ClS}$ $\geq 97,0\%$) en solución de etanol absoluto. En cuanto a los plaguicidas estudiados fueron todos adquiridos en Merck; tiram, N,N-dimetilcarbamoilato de dimetilcarbomotiolsulfanilo ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_4$ $\geq 98,0\%$); tiabendazol, 2-(4-tiazolil) benzimidazol ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{S}$ $\geq 99,0\%$); carbendazim, metil benzimidazol-2-ilcarbomato ($\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ $\geq 97,0\%$). Todos los reactivos fueron utilizados sin previa purificación.

Las frutas y vegetales fueron compradas en un supermercado local de la ciudad de La Plata, Buenos Aires, con excepción del morrón verde y la berenjena empleados para el análisis de tiram que fueron adquiridos a un productor orgánico de la localidad de Hudson, Buenos Aires. Todas las frutas y verduras fueron lavadas empleando agua de la canilla y posteriormente fueron enjuagadas con agua mili-Q antes de ser utilizadas.

La espectroscopia SERS se caracteriza por ser una técnica ultrasensible, razón por la cual fue imprescindible trabajar en condiciones de extrema limpieza para evitar contaminaciones no deseadas, ya que pueden originarse interferencias a la hora de

realizar las medidas. Por lo tanto, los materiales empleados fueron lavados siguiendo protocolos específicos detallados a continuación.

➤ Limpieza de material de Laboratorio:

Todo el material de vidrio fue lavado siguiendo protocolos dependientes de las sustancias empleadas [1]. Para oxidar toda la materia orgánica del material que se utilizó para la preparación de las soluciones de los diferentes plaguicidas se utilizó el tratamiento con permanganato de potasio (KMO_4) y en el caso del material de vidrio expuesto o en contacto directo con las nanopartículas se empleó agua regia para su lavado.

El tratamiento con KMO_4 consiste en sumergir todo el material de vidrio no volumétrico en una solución sobresaturada de KMnO_4 (en medio básico), la cual se lleva a ebullición y se mantiene en esta condición durante ~ 20 min. Posteriormente, se enjuaga con agua destilada y luego con una solución de H_2O_2 acidificada (lo que permite remover el MnO_2 , resultante de la oxidación del paso anterior). Finalmente, se enjuga todo el material con agua mili-Q y se seca en estufa a $100\text{ }^\circ\text{C}$. Para lavar los materiales de vidrio volumétricos, se sumergió todo el material en una solución sobresaturada de KMnO_4 (en medio básico), y se dejó actuar durante 24 h a temperatura ambiente; posteriormente se enjuaga el material con agua destilada y seguidamente con una solución de H_2O_2 acidificada para remover el MnO_2 . Por último, se enjuaga todo el material volumétrico con agua mili-Q y se secó a temperatura ambiente.

El material de vidrio utilizado para la síntesis de nanopartículas de plata se limpió con agua regia (mezcla de ácido clorhídrico y ácido nítrico concentrado en una proporción 3:1) a través de contacto entre el material y el agua regia por algunos minutos; esto permite la eliminación de metales de manera eficiente. Luego, el material se enjuaga repetidamente con agua mili-Q y se seca en estufa a $100\text{ }^\circ\text{C}$.

4.3. Técnicas instrumentales

Todos los equipos utilizados durante la tesis pertenecen al Centro de Química Inorgánica "Dr. Pedro J. Aymonino" (CEQUINOR) con la excepción del microscopio electrónico con el cual, gracias a la colaboración del laboratorio de microscopia

electrónica de YTEC-CONICET y especialmente a la Lic. María Alejandra Florida Addato, se pudieron llevar a cabo las caracterizaciones de las nanopartículas mediante esta técnica.

4.3.1. Espectroscopia UV-Visible (UV-Vis)

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica muy empleada para la caracterización de las propiedades ópticas de nanomateriales metálicos en suspensión. Como se mencionó en la **sección 2.5.4.**, la excitación plasmónica puede ser medida de forma rápida y sencilla a partir de la toma de los espectros de absorción UV-Vis.

En este trabajo las nanopartículas de plata sintetizadas fueron caracterizadas en una primera instancia mediante la adquisición de espectros UV-Vis de las dispersiones de las nanopartículas recién sintetizadas. Todos los espectros fueron adquiridos empleando un espectrómetro UV-Vis de absorción Shimadzu UV-2600 (**Figura 4.1.**) en el rango de longitudes de onda de 190-900 nm usando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Los espectros obtenidos fueron procesados mediante el software *OriginPro 8.5*.

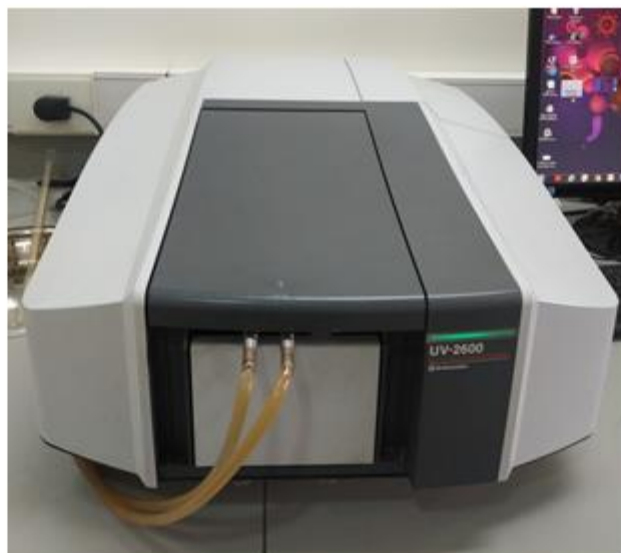


Figura 4.1.: Espectrómetro UV-Vis de absorción Shimadzu UV-2600.

Adicionalmente, se estudiaron por espectroscopia UV-Vis soluciones de los analitos utilizados en esta Tesis. Para ello, se prepararon soluciones de: TBZ en

metanol (rango utilizado 205-900 nm); CBZ, tiram y MB en etanol absoluto (rango 210-900 nm). Los diferentes rangos de medida utilizados son debido a la longitud de onda de corte (*cut-off*) de los solventes empleados. Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la posibilidad de presentar el fenómeno SERRS.

➤ **Espectroscopia UV-visible por reflectancia difusa (UV-Vis DRS)**

Las propiedades ópticas de los sustratos SERS fueron estudiados usando UV-Vis-DRS (del inglés, *Diffuse reflectance spectroscopy*) ya que proporciona información sobre el entorno de las nanopartículas en el material utilizado como soporte. Para la caracterización de los sustratos SERS flexibles se utilizó un accesorio del espectrofotómetro UV-2600 mencionado anteriormente, que consta de una esfera integradora modelo ISR-2600 (**Figura 4.2.**).



Figura 4.2.: Accesorio de espectrómetro UV-Vis de absorción Shimadzu UV-2600: esfera integradora modelo ISR-2600 para medir los espectros de reflectancia difusa (UV-Vis-DRS). Detalle del accesorio de esfera integradora. a) Portamuestras para celdas de cuarzo utilizadas para suspensiones líquidas. b) Portamuestras para pastillas de BaSO₄ utilizadas para muestras sólidas. c) Portamuestras para films.

Para medir los espectros de reflectancia difusa (UV-Vis-DRS) se utilizó como referencia BaSO₄. Los espectros medidos fueron tomados en el rango de longitudes de

onda de 200-900 nm, a excepción de los experimentos DRS en los que se emplearon cubreobjetos de vidrio para fijar el sustrato al accesorio; en ese caso las medidas se realizaron en el rango de 400-900 nm. (Figura 4.3.).

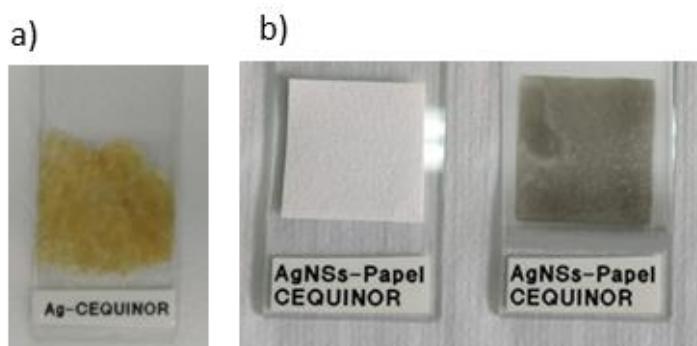


Figura 4.3.: Sustratos para la toma de espectros DRS-UV-Vis. a) Sustrato de AgNPs inmovilizadas en gel de agar hidratado colocado entre un portaobjeto y un cubreobjeto de vidrio. b) Sustrato de papel de celulosa sin y con AgNSs.

4.3.2. Microscopía Electrónica

Para la caracterización morfológica (tamaño, forma y estructura de agregación) de las nanopartículas de plata fueron empleadas técnicas de microscopía electrónica: microscopía electrónica de transmisión (TEM del inglés, *transmission electron microscopy*), donde la imagen resulta de la perturbación local del campo de electrones al atravesar una muestra delgada y el microscopio electrónico de barrido (SEM del inglés, *scanning electron microscope*), que emplea un haz de electrones muy fino que escanea la superficie de la muestra y crea una imagen a partir de los electrones retrodispersados y los electrones secundarios emitidos. Además, en el TEM también se puede operar de modo exploratorio; esta modificación es comúnmente conocida como microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM del inglés, *Scanning transmission electron microscopy*). La microscopía electrónica se realiza en alto vacío ($\sim 10^{-3} - 10^{-4}$ Pa) [2], lo que impone requisitos específicos para la preparación de la muestra. Las partículas de suspensiones coloidales tienen que depositarse sobre un sustrato apropiado, por ejemplo, películas de carbón o sílice [3,4].

Para la caracterización morfológica de las AgNPs “esféricas” sintetizadas se empleó microscopía STEM, utilizando un microscopio SEM-FEI modelo SCIOS 2 con la

aplicación de un voltaje de aceleración de 30 kV para recolectar las imágenes utilizando el detector HAADF (campo oscuro anular de ángulo alto). En el caso de las nanoestrellas de plata se caracterizaron con un microscopio TEM, modelo TEM-FEI talos F200X con un voltaje de aceleración de 200 kV. Las muestras fueron agitadas y posteriormente se colocaron sobre grillas de cobre gota a gota de manera repetitiva (*ULTRA/THIN C ON LACEY C PKG/25 de Ted Pella, Microscopy Products For Science and Industry*), evitando sobrecargar las grillas y finalmente se recolectaron las imágenes.

4.3.3. Espectroscopia Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Como se mencionó en el capítulo 2 la espectroscopia SERS es extremadamente sensible a las impurezas y más aún cuando se intenta detectar trazas de plaguicidas. Por esta razón, se determinó y verificó la identidad de los distintos agroquímicos tomando espectros FTIR en el rango $4000-400\text{ cm}^{-1}$ utilizando un espectrómetro NICOLET 6700 (Thermo Scientific) y Thermo Nicolet (Nexus) (**Figura 4.4.**) empleado en la zona $600-180\text{ cm}^{-1}$ equipado con dos detectores; uno criogénico MCTB que se utiliza en el rango de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ y un detector DTGS para el rango de $600-180\text{ cm}^{-1}$. Ambos espectrómetros pueden operar con una resolución de hasta $0,125\text{ cm}^{-1}$. Para la toma de los espectros FTIR se prepararon pastillas de KBr de las diferentes sustancias estudiadas y se colectaron los espectros con resolución de 1 cm^{-1} y 64 acumulaciones. Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa OMNIC y se corroboró el espectro FTIR de cada compuesto con ayuda de material bibliográfico. Las intensidades de las absorciones se determinaron a partir de la medición del área debajo de cada pico.

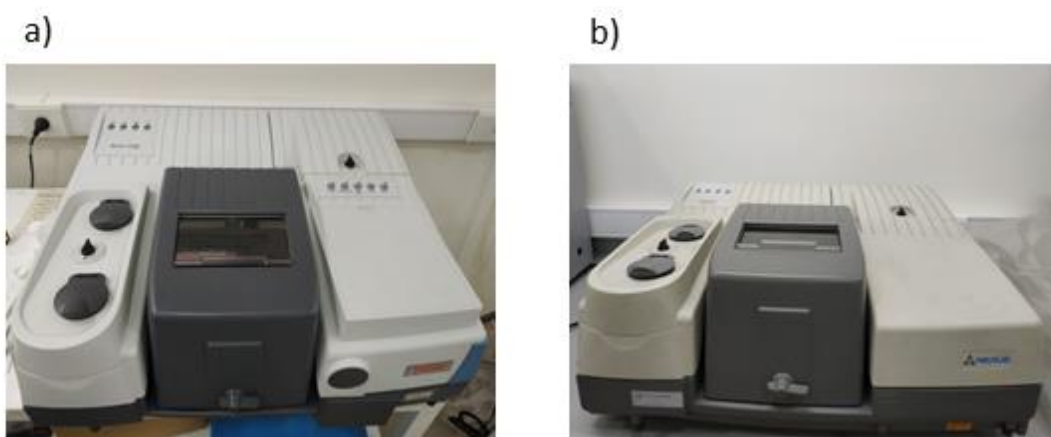


Figura 4.4.: a) Espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Scientific); b) Espectrómetro Thermo–Nicolet modelo Nexus.

4.3.4. Espectroscopia Raman

Los espectros Raman fueron tomados empleando un microespectrómetro Raman HORIBA Jobin Yvon T64000, que cuenta con tres redes de difracción, un microscopio confocal y un detector CCD (**Figura 4.5.**). El laboratorio cuenta con dos láseres iónicos multilíneas, uno de Ar^+ y otro de Kr^+ , teniendo a disposición las líneas de 476,5; 488,0; 496,5; 501,7; 514,5 nm y 647,1; 676,4 nm, respectivamente para los láseres mencionados. El equipo se calibró con Si o con CCl_4 , empleando las bandas a 520,7 y 459,0 cm^{-1} , respectivamente. Se evaluó la respuesta de las diferentes líneas de los láseres para las sustancias empleadas.

Para las muestras sólidas se prepararon capilares conteniendo el polvo compactado de las sustancias en estudio y luego fueron sellados a la llama. Las muestras se excitaron empleando el láser rojo de 647,1 nm de longitud de onda con una potencia de salida del láser de ~ 100 mW y un objetivo de 10x (0,25NA). Se midió la potencia que llega a la muestra con la ayuda de un potenciómetro (*Laser CheckCoherent*), correspondiendo a un valor aproximado de ~ 3 mW. De la misma manera que los sólidos contenidos en capilares se midieron las soluciones concentradas de los diferentes plaguicidas en los solventes utilizados en cada uno de los casos. Los espectros Raman fueron analizados usando el software *LabSpec 5.45.09*.

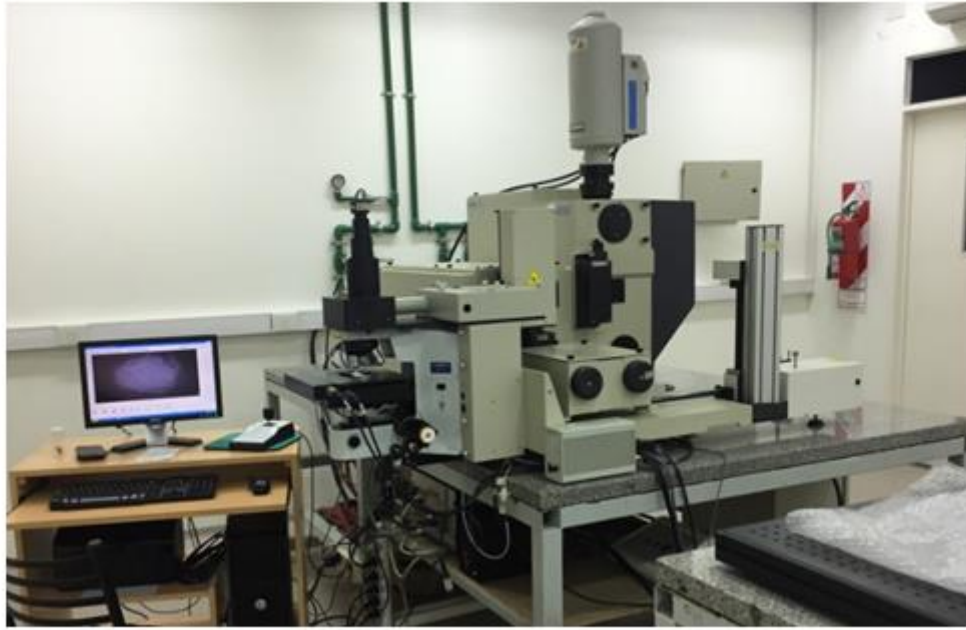


Figura 4.5.: Espectrómetro Raman con microscopio confocal.

4.3.5. Espectroscopia SERS

Los espectros SERS fueron tomados enfocando el haz del láser sobre las superficies de los sustratos SERS empleando un objetivo de 50x (0,75 NA) y se trabajó en la mayoría de los casos con la línea de 647,1nm y con una potencia a la salida del láser de ~ 100 mW (**Figura 4.6.**). Todas las líneas disponibles en el laboratorio mencionadas anteriormente fueron evaluadas previamente para determinar la mejor respuesta del sistema. Adicionalmente, se midió la potencia que llega a la muestra con el potenciómetro antes mencionado, arrojando un valor de $\sim 1,0$ - $1,5$ mW sobre la muestra cuando el objetivo empleado es el de 50x. La estabilidad y la uniformidad de las muestras SERS fueron evaluadas tomando varios espectros de la superficie de los mismos (entre 5-10 *spots*) además, se seleccionaron algunos de los sustratos para tomar mapas SERS ya que el espectrómetro Raman permite realizar mapeos, es decir, la posibilidad de medir espectros en una grilla de puntos (mapas) en una (X), dos (XY) o tres (XYZ) dimensiones, con la platina motorizada que contiene el equipo. En la mayoría de los espectros tomados se utilizó el rango de números de onda de 180 a 1800 cm^{-1} . Todos los espectros SERS fueron analizados usando software *LABSpec 5.45.09*.

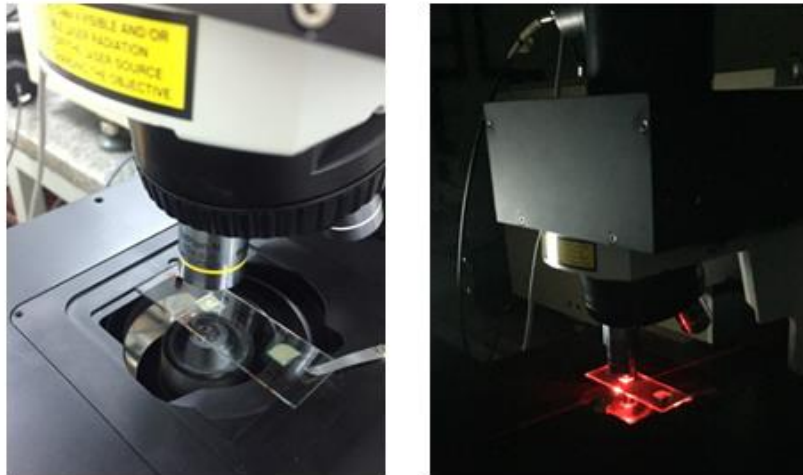


Figura 4.6.: Espectrómetro Raman con microscopio confocal. En la imagen se visualiza la platina con microscopio confocal.

Además, el equipo cuenta con una celda accesoria Linkam THMS600 para microscopía Raman, que permite realizar medidas Raman con variación de temperatura (**Figura 4.7.**). La misma posee un controlador de temperatura *T95 System Controller* y una bomba de enfriamiento de nitrógeno líquido LNP95 que permite realizar rampas de temperatura con una velocidad máxima de 150 °C/min. Además, el sistema permite la circulación de gas por el interior de la celda mediante válvulas. La celda está diseñada para poder ser colocada en la platina del microscopio. Esta celda se empleó para hacer ensayos principalmente con MB donde se fue variando la temperatura en el rango de -160 a 60 °C; los resultados no serán expuestos de manera extensa ya que escapan de los objetivos de la tesis.



Figura 4.7.: Celda *Linkam THMS600* acoplada al espectrómetro Raman con microscopio confocal.

El diámetro de spot en microscopia Raman está determinado por la longitud de onda de excitación del láser y el objetivo que se emplea [5, 6]. En la ecuación 4.1. se presenta la formula general que permite determinar el diámetro del spot, donde λ es la longitud de onda del láser y NA es la apertura numérica del objetivo del microscopio. La NA esta dado por el objetivo de microscopio y se encuentra detallado en el recubrimiento externo de la lente e indica la cantidad de luz que puede captar y luego enviar hacia la muestra.

$$Diametro\ de\ spot = \frac{1,22\ \lambda}{NA} \quad (4.1.)$$

A lo largo de la tesis se empleó mayoritariamente la longitud de excitación de 647,1 nm con los objetivos de 10x (0,25 NA) para la toma de los espectros Raman de los capilares de vidrio relleno con los sólidos de los analitos, solventes o soluciones y el objetivo de 50x (0,75 NA) para la toma de los espectros SERS. Aplicando la ecuación 4.1. para cada uno de los casos podemos determinar que el diámetro del spot para el objetivo de 10x (0,25 NA) es de ~ 3158 nm (~ 3 μ m) mientras que para el objetivo de 50x (0,75 NA) es de ~ 1053 nm (~ 1 μ m).

4.4. Referencias

[1] Dalfovo, M. C. **2016**. *Diseño de plataformas sensibles empleando grafeno y nanopartículas metálicas* (Tesis de doctorado, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas-Departamento de Química).

[2] Broens, M. I. **2021**. *Preparación de películas nanoestructuradas de TiO₂ modificadas con nanopartículas metálicas para su aplicación en Espectroscopia Raman Incrementada por Superficie*. (Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas).

[3] Babick, F. **2016**. *Suspensions of Colloidal Particles and Aggregates*. Particle Technology Series Frank Babick. Volume 20.

[4] Hirschle, P.; Preiß, T.; Auras, F.; Pick, A.; Völkner, J.; Valdepérez, D.; Witte, G.; Parak, W. J.; Rädlerb, J. O. y Wuttke, S. *CrystEngComm*, **2016**, 18, 4359.

[5] Horiba scientific.

<https://www.horiba.com/int/scientific/technologies/raman-imaging-and-spectroscopy/raman-analysis/>. Consultado noviembre 2022.

[6] Montalvo Arenas, C. E. **2010**. Microscopía. <https://filadd.com/doc/2-microscopia-pdf-biologia-celular-e-histologia>

CAPÍTULO 5

FABRICACIÓN DE

SUSTRATOS SERS

5.2. Síntesis de nanopartículas de plata

A lo largo de esta tesis doctoral, se sintetizaron dos tipos de nanopartículas de plata: nanopartículas “esféricas” (AgNPs) y nanoestrellas de plata (AgNSs). Ambas fueron caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas y de microscopía electrónica previamente a la fabricación de los sustratos SERS flexibles. En las secciones posteriores se hará referencia al proceso de síntesis como así también a la caracterización de las mismas.

5.2.1. Nanopartículas de plata “esféricas” (AgNPs)

Para la síntesis de nanopartículas de plata “esféricas” fue empleado un procedimiento ya informado [1]. Esta preparación se divide en dos etapas principales; la primera de ellas involucra la síntesis de “semillas” de AgNPs y posteriormente, a partir de las semillas sintetizadas se lleva a cabo el crecimiento de las mismas.

La síntesis de las “semillas” de AgNPs fue realizada por reducción de AgNO_3 con NaBH_4 en frío en presencia de citrato trisódico. Para ello, se prepararon 20,0 mL de solución acuosa $2,5 \times 10^{-1}$ mM de citrato trisódico al igual que de nitrato de plata. Posteriormente, se añadió a la solución anterior 0,60 mL de solución de NaBH_4 $1,0 \times 10^1$ mM previamente enfriada con hielo, y se agitó vigorosamente durante 2 h. La dispersión cambió de color pasando de incolora a amarilla después de la adición de NaBH_4 , como se observa en la **Figura 5.1.a**. Estas partículas sintetizadas fueron utilizadas como “semillas” para la siguiente etapa de crecimiento.

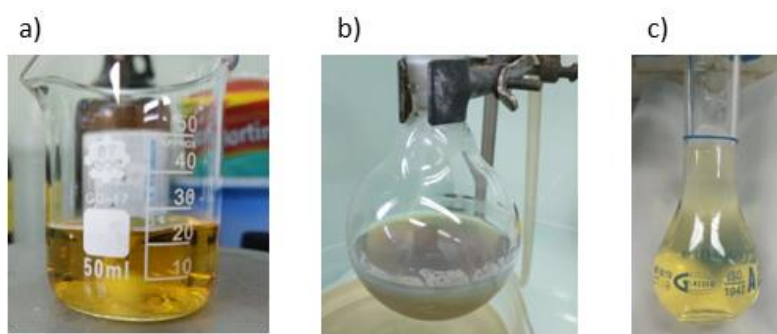


Figura 5.1.: Síntesis de nanopartículas de plata. a) Síntesis de semillas de NPs. b) Crecimiento de NPs por calentamiento a reflujo. c) Solución 1:10 de la dispersión de AgNPs.

Según lo informado por Isanova y col. [1], el diámetro final de las nanopartículas de Ag se puede controlar variando la relación molar $\text{Ag}^+/\text{Ag}_{\text{semillas}}$ en solución, donde Ag^+ hace referencia al número de moles total de AgNO_3 , mientras que $\text{Ag}_{\text{semillas}}$ corresponde a los moles de Ag presente en las “semillas” de las NPs. De esta manera, a medida que la relación $\text{Ag}^+/\text{Ag}_{\text{semillas}}$ es mayor, el tamaño de las nanopartículas se incrementa. La relación ($\text{Ag}^+/\text{Ag}_{\text{semillas}}$) empleada a lo largo de este trabajo fue de 100:1. Para ello se llevaron a ebullición 10,0 mL de AgNO_3 $1,0 \times 10^{-2}$ M con 90,0 mL de agua bidestilada seguido de la adición de 2,0 mL de solución de citrato trisódico al 1% y 4,0 mL de la dispersión de “semillas” de AgNPs llegando a un volumen final de 106 mL (**Figura 5.1.b**). Luego de 1 h de ebullición y agitación, se dejó enfriar a temperatura ambiente la dispersión de nanopartículas de plata obtenidas, y posteriormente fueron caracterizadas mediante espectroscopia UV-Vis y microscopia STEM. Finalmente, las AgNPs se almacenaron en la heladera hasta su uso. Esta síntesis se repitió numerosas veces en el transcurso de la tesis. Adicionalmente, se determinó la estabilidad de las dispersiones de NPs a lo largo del tiempo, para lo cual se tomaron espectros UV-Vis regularmente para evaluar su comportamiento.

En la **Figura 5.2.** se muestra el espectro UV-Vis de la dispersión de AgNPs tomado inmediatamente después de la síntesis descrita anteriormente. Para realizar la medida de los espectros se empleó una dilución 1:10 de la dispersión de AgNPs con agua mili-Q (**Figura 5.1.c**). En los espectros se observó el máximo de absorbancia

alrededor de 437 nm, con un ancho a media altura de ~ 157 nm, lo cual fue coincidente con el valor reportado según el tamaño de las AgNPs y teniendo en cuenta posibles agregaciones [1].

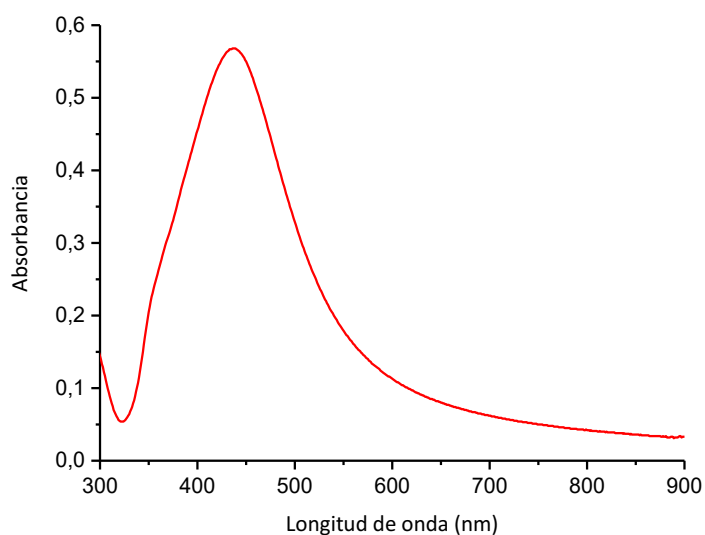


Figura 5.2.: Espectro de absorción UV-Vis de la dispersión de AgNPs. El espectro corresponde a una dilución de 1:10 de la dispersión de AgNPs con agua mili-Q.

Complementariamente, como fue mencionado previamente, se determinó el tamaño y morfología de las AgNPs empleando microscopía STEM. En la **Figura 5.3.** se muestran las imágenes STEM obtenidas de las nanopartículas y en la **Figura 5.4.** se presenta el histograma de distribución de tamaños obtenido junto con el ajuste realizado con una función logarítmica normal. Se determinó a través del análisis de las imágenes STEM que el diámetro promedio de las NPs sintetizadas fue de $45,3 \pm 0,9$ nm.

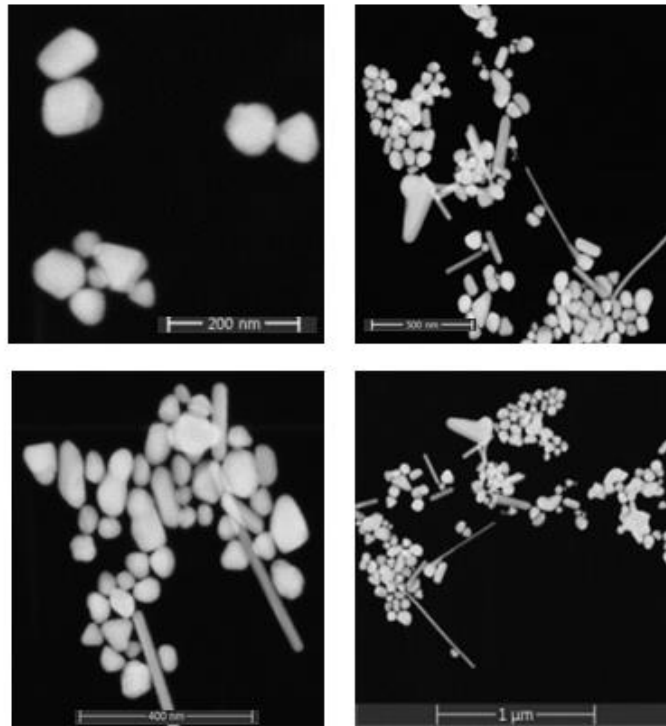


Figura 5.3.: Imágenes STEM de las nanopartículas de plata sintetizadas. Determinación de tamaño y forma.

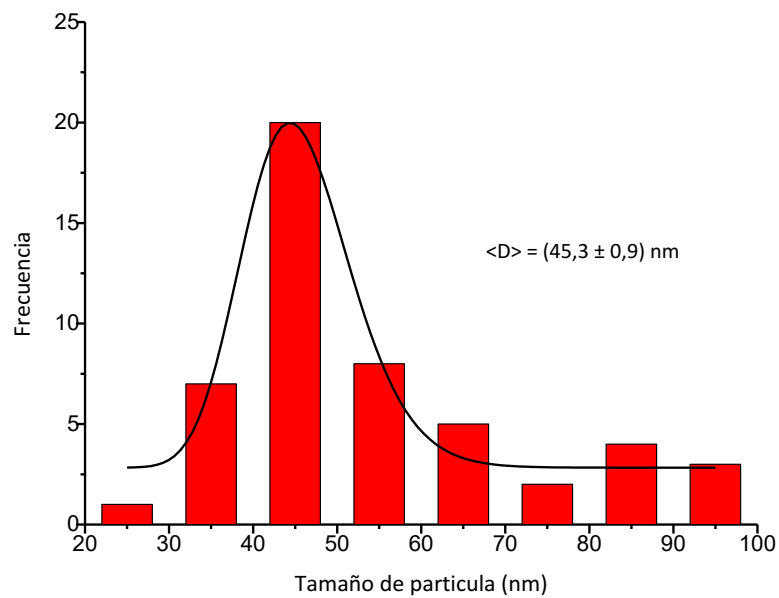


Figura 5.4: Histograma de distribución de tamaño de las AgNPs sintetizadas junto con el ajuste logarítmico normal.

Adicionalmente, se evaluó la estabilidad de la dispersión de AgNPs a lo largo del tiempo; en la **Figura 5.5.** se puede ver la comparación de los diferentes espectros UV-Vis recolectados en diferentes momentos a lo largo de transcurrido aproximadamente 1 año de la síntesis. En la Figura es posible observar que el máximo de absorción presentó una caída de aproximadamente el 14% luego de transcurrido un año, mostrando la gran estabilidad de la dispersión de las nanopartículas en el tiempo.

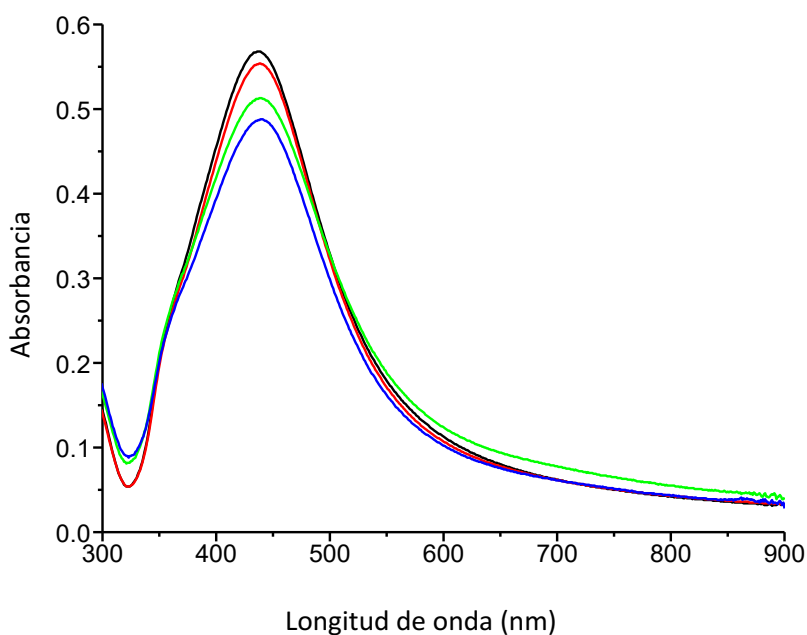


Figura 5.5.: Espectros de absorción UV-Vis de la dispersión de nanopartículas de Ag obtenido inmediatamente luego de su síntesis (línea negra), y luego de 5 meses (línea roja), 7 meses (línea verde) y un año (línea azul) desde su síntesis. Todos los espectros corresponden a una dilución de 1:10 de las AgNPs con agua mili-Q.

5.1.2. Nanoestrellas de plata (AgNSs)

Las nanoestrellas de plata fueron sintetizadas, al igual que en el caso anterior, empleando un protocolo ya reportado [2]. La suspensión coloidal de AgNSs fue preparada por reducción química de la Ag^+ en dos etapas, primero empleando un agente reductor neutro, la hidroxilamina (NH_2OH) y luego, en una segunda reducción utilizando citrato trisódico. El ion citrato es fácilmente removido de la superficie por la presencia de otros analitos, por lo que no interfiere en las medidas SERS. Básicamente, la preparación de las AgNSs consiste en agregar a 9,0 mL de una solución de $AgNO_3$

$1,0 \times 10^{-3}$ M en agitación intensa, 0,50 mL de una solución de NH_2OH $6,0 \times 10^{-2}$ M y 0,50 mL de NaOH $5,0 \times 10^{-2}$ M. Esto provoca que la solución inicial cambie de incolora a gris intenso por formación de AgNSs, como se observa en la **Figura 5.6**. Luego de 5 min de agitación vigorosa, se añadió 0,10 mL de la solución de citrato trisódico $4,13 \times 10^{-2}$ M a la mezcla. La suspensión final se agitó durante 10 min, y posteriormente, se caracterizaron las nanopartículas obtenidas empleando espectroscopia UV-Vis y microscopía TEM. Finalmente, se reservaron las AgNSs sintetizadas en la heladera hasta su empleo.



Figura 5.6.: Dispersión de nanoestrellas de plata sintetizadas por cuadruplicado.

En la **Figura 5.7**. se pueden observar los espectros UV-Vis obtenidos de las dispersiones de nanoestrellas de plata recolectadas de varias experiencias realizadas durante este trabajo, y tomadas inmediatamente después de la síntesis mencionada. Los espectros UV-Vis fueron medidos en solución acuosa utilizando una dilución de 1:1 con agua mili-Q. En los mismos, se observa el máximo de absorbancia ~ 378 nm que es asociado al plasmón resonante. A longitudes de ondas mayores (~ 750 nm) se observa una cola de señal lo que podría ser atribuido a la absorción de nanopartículas con diferentes morfologías (número de brazos o protuberancias, la presencia de nanopartículas esféricas y agregados entre partículas) que se encuentran junto a las AgNSs [2,3,4,5]. Sin embargo, algunos autores han determinado con ayuda de cálculos computacionales [6] que la cola observada ~ 750 nm no está determinada únicamente por la heterogeneidad en la cantidad de brazos de las NSs sino que se asocia a la resonancia dipolar del plasmón, es decir, se debe a una componente residual de la excitación resonante dipolar del plasmón que para tamaños tan grandes de partículas

se encuentra fuera de la región UV-Vis. Por esta razón, se midieron las dispersiones concentradas de las AgNSs empleando un espectrofotómetro computarizado de rango UV-Vis-NIR (ultravioleta-visible-IR cercano). El espectrofotómetro se encuentra equipado con 3 detectores: fotomultiplicador, InGaAs y de sulfuro de plomo refrigerado. Esta medida fue posible gracias a la colaboración de la Prof. Dra. María Antonieta Daza Millone. Para medir los espectros UV-Vis-NIR se empleó una dilución de 1:1 con agua mili-Q y se utilizó el rango de 200-1400 nm. En la **Figura 5.8.** se observa el espectro UV-Vis-NIR obtenido donde se evidencia más claramente el incremento de la cola observada en la **Figura 5.5.**, lo que se encuentra en concordancia con lo previamente citado.

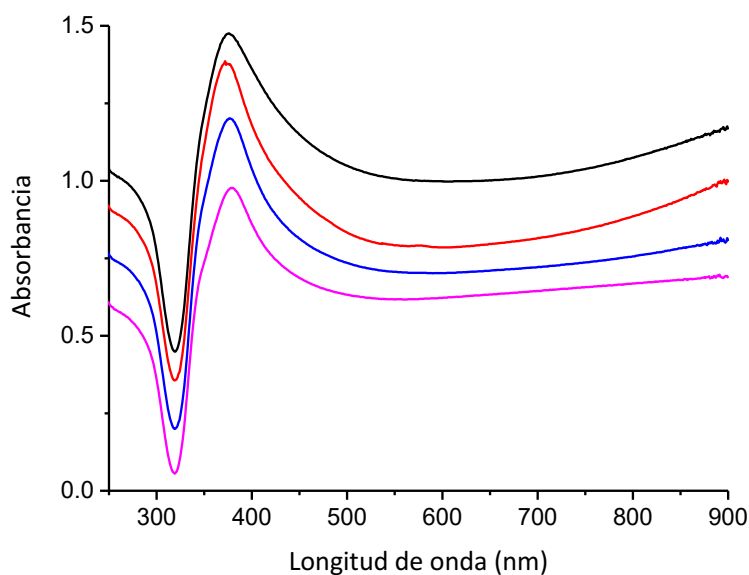


Figura 5.7.: Espectros UV-Vis obtenidos inmediatamente después de las síntesis de AgNSs correspondiente a la síntesis por cuadruplicado anteriormente mencionada .

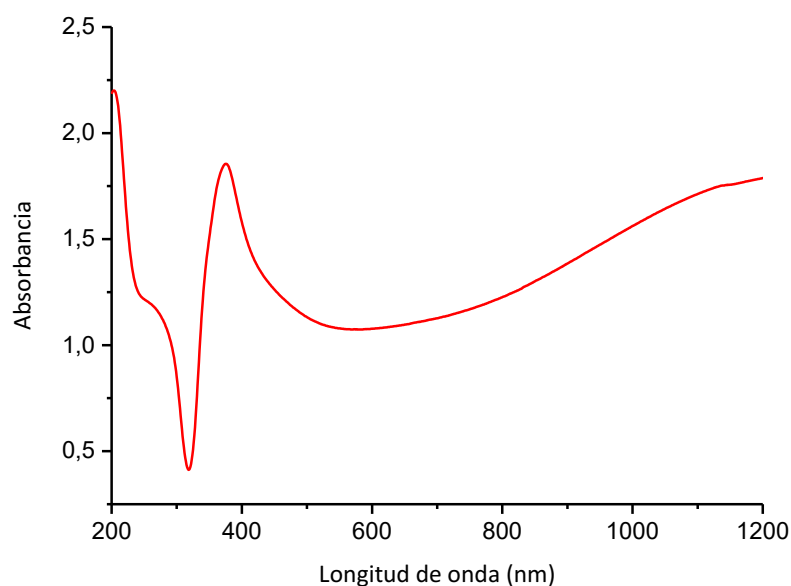


Figura 5.8.: Espectro UV-Vis-NIR obtenido de las AgNSs medido inmediatamente después de su síntesis.

Como se mencionó en secciones anteriores, para producir un incremento notable de las señales Raman por efecto SERS, las partículas anisotrópicas como los conformados por las AgNSs no requieren agregación como en el caso de las nanopartículas “esféricas” ya que forman puntos calientes o *hot spots* de grandes intensificaciones del campo eléctrico en las puntas o bordes o entre el espacio entre sus brazos.

Análogamente a lo realizado para las nanopartículas de plata “esféricas”, se determinó el tamaño y morfología de las AgNSs sintetizadas mediante microscopía electrónica TEM. Las imágenes TEM evidencian que las AgNSs sintetizadas presentan un tamaño aproximado de 200-400 nm y un promedio de 8-12 brazos con un ancho de ~ 50 nm cada uno de ellos. Cabe señalar que muchos de los brazos de las NSs presentaron pequeñas ramificaciones (en forma de helecho) como se presenta a continuación en la **Figura 5.9.**

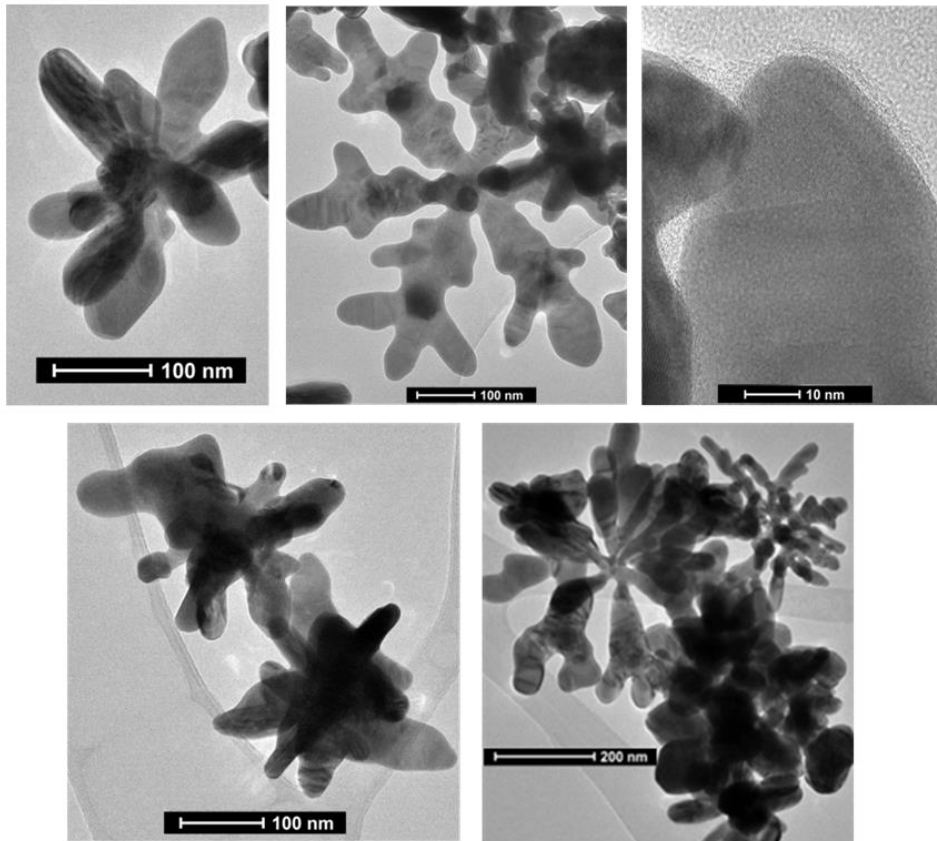


Figura 5.9.: Imágenes TEM de la dispersión de las AgNSs sintetizadas con un tamaño ~ 200-400 nm y un promedio de 8-12 brazos ramificados con un ancho de ~ 50 nm cada uno de ellos. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio TEM, modelo TEM FEI talos F200X con un voltaje de aceleración de 200 kV

La estabilidad de la dispersión de nanoestrellas fue seguida e en el tiempo mediante la toma de los espectros UV-Vis luego de 24, 48 y 72 h posteriores de su síntesis. Durante todo este tiempo la dispersión fue conservada en la heladera y al abrigo de la luz. De manera análoga al cálculo realizado para evaluar la estabilidad de la dispersión de AgNPs “esféricas” en el tiempo, se realizó para las AgNSs observándose un decaimiento de la señal aproximadamente del 14 % luego de las primeras 72 h, que puede asociarse a la precipitación de las partículas de mayor tamaño (**Figura 5.10.**).

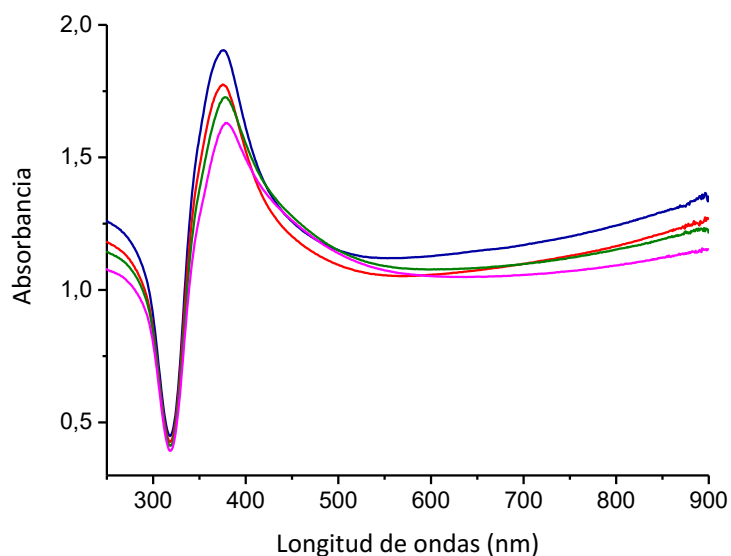


Figura 5.10.: Seguimiento de la estabilidad de la dispersión de AgNSs inmediatamente después de la síntesis (línea azul), 24 h (línea roja), 48 (línea verde) y 72 h (línea rosa) posteriores a su síntesis.

5.3. Preparación de sustratos SERS flexibles

Para la determinación de residuos de plaguicidas en cáscaras de frutas y vegetales se emplearon sustratos SERS flexibles soportados sobre dos tipos de materiales: **(1)** gel de agar y **(2)** papel de filtro de celulosa. Estos sustratos presentan la ventaja frente a los sustratos SERS rígidos de poder realizar determinaciones directas e *in situ* sobre superficies rugosas como son las de los alimentos. Se desarrollaron, caracterizaron y posteriormente se evaluaron 2 plataformas SERS; la primera de ellas consistió en las AgNPs “esféricas” inmovilizadas en un gel de agar (*sustrato 1*) y en el segundo caso, se utilizó papel de filtro de celulosa como soporte de las AgNSs (*sustrato 2*).

5.3.1. Gel de agar (*Sustrato 1*)

El gel de agar con las AgNPs se preparó de acuerdo con el procedimiento informado por Platania y col [7]. Para ello se colocaron 10,0 mL de la dispersión de AgNPs sintetizada en un vaso de precipitado con 0,20 g de agar y la mezcla se calentó en un microondas a 700 W hasta observar que la entre en ebullición unos segundos.

Posteriormente, la mezcla se vertió sobre una caja de Petri alcanzando una altura de aproximadamente 0,5 cm. Una vez enfriada, la caja de Petri se envolvió con papel de aluminio y se almacenó en heladera hasta su uso. Además, se preparó gel de agar sin AgNPs con fines de referencia y comparativos utilizando 10,0 mL de agua milli-Q en lugar de la dispersión de nanopartículas. Luego de que el agar estuvo gelificado se caracterizó el sustrato SERS mediante UV-Vis-DRS del gel de agar hidratado con y sin nanopartículas de plata. En la **Figura 5.11.** se puede ver el espectro de absorción del gel con AgNPs que presenta un máximo alrededor de 392 nm y un hombro a 437 nm. El plasmón desplazado hacia el azul también fue reportado [8], y se sugirió que podría deberse a la dispersión por la red del gel.

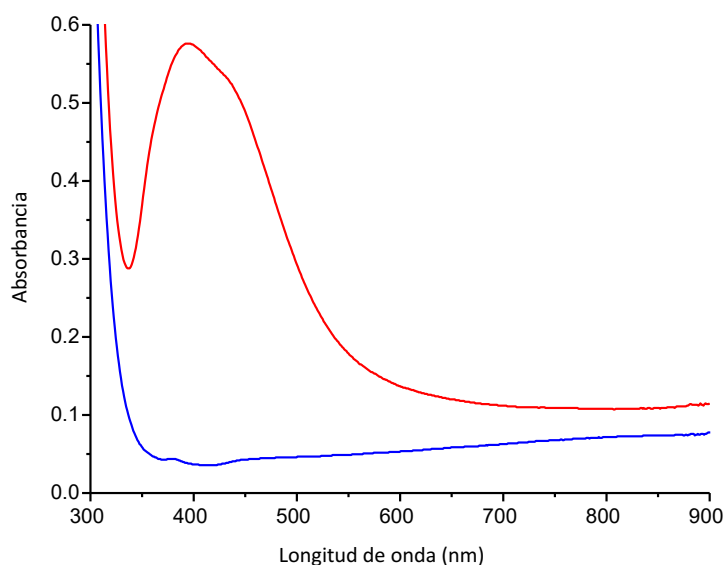


Figura 5.11.: Espectros de absorción UV-Vis DRS del gel de agar hidratado con AgNPs (línea roja) y sin AgNPs (línea azul). Los espectros fueron tomados colocando cada gel entre un portaobjeto y un cubreobjeto de vidrio, empleando como referencia BaSO_4 .

Es importante mencionar, que a lo largo de la tesis también se ensayó el sistema formado por los sustratos basados en gel de agar con las AgNSs. El proceso de elaboración del sustrato requiere calentamiento de las NSs hasta ebullición, y es esperable que las AgNSs no sean estables a altas temperaturas [9]. Para verificar esto, se realizaron ensayos mediante la toma de espectros UV-Vis de NSs que fueron sometidas a calentamiento hasta ebullición (temperatura de formación del gel de agar). En la **Figura 5.12.** se muestra un espectro obtenido para la dispersión de AgNSs luego de ser sometida a calentamiento y se observa que tiene características similares

al espectro de las nanopartículas “esféricas” lo que sugiere la pérdida de las ramificaciones. El efecto de la temperatura en las NSs fue evaluado previamente por Barbosa y col. [9], donde los autores determinaron que la temperatura puede alterar la estabilidad de la morfología ramificada de las NSs, ya que las nanopartículas anisotrópicas pueden reorganizarse fácilmente a temperaturas superiores de 60 °C mostrando luego de ser expuestas un espectro UV-Vis característico de las nanopartículas con morfología esférica.

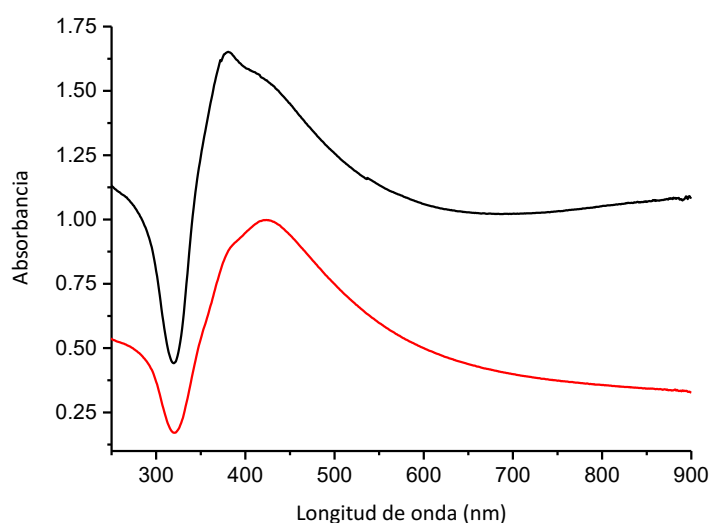


Figura 5.12.: Espectros de absorción UV-Vis de las AgNSs antes (línea negra) y posterior a exponerla a la temperatura de formación del sustrato de gel agar (línea roja).

5.3.2. Papel de filtro (*Sustrato 2*)

Para el desarrollo de las plataformas SERS soportadas en papel de filtro con AgNSs, primero se centrifugaron a velocidad media durante 1 h las dispersiones acuosas de AgNSs con el objetivo de separar por tamaño las diferentes poblaciones de NSs de las dispersiones obtenidas. Posteriormente, se separó el sobrenadante de las nanopartículas con ayuda de una micropipeta dejando un volumen final de 1,0 mL. Debido al gran volumen requerido de las NSs para la preparación de los sustratos SERS se requirió la síntesis y centrifugación de la preparación por cuadruplicado como se observa en **Figura 5.13**.

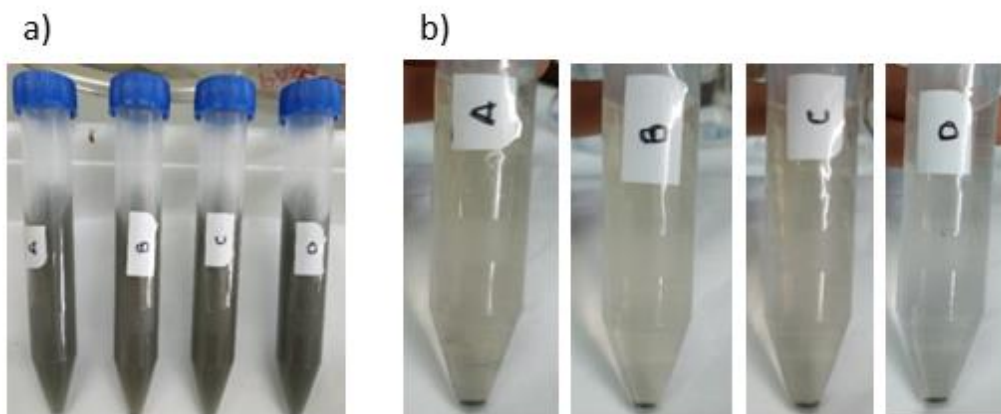


Figura 5.13.: Nanoestrellas a) antes y b) después de la centrifugación, por cuadruplicado.

Para verificar o corroborar la correcta separación de las nanoestrellas del sobrenadante, se tomaron espectros UV-Vis de ambos componentes (**Figura 5.14.**), detectando la presencia de casi la totalidad de las AgNSs en el precipitado, mientras que en el sobrenadante no se observó señal alguna correspondiente a las NSs. Luego se prosiguió a juntar los precipitados para su posterior utilización para preparar los sustratos SERS.

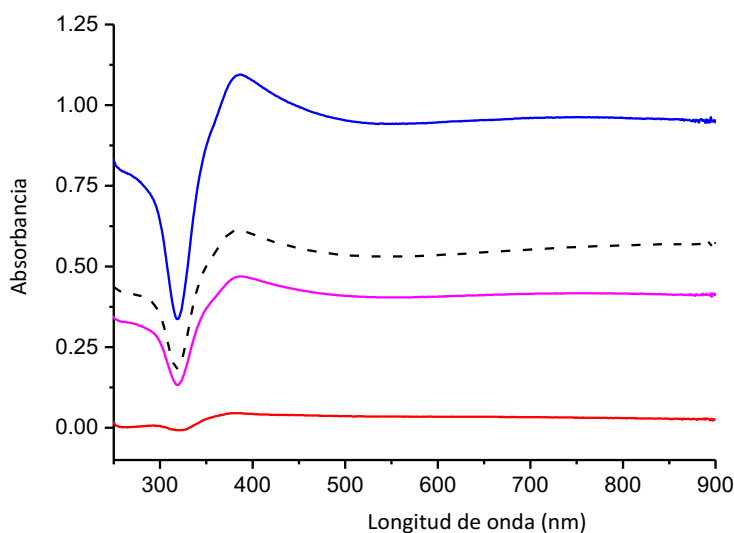


Figura 5.14.: Espectros UV-Vis de las AgNS antes (línea de punto), y después de centrifugar la suspensión. Centrifugado con dilución 1:1 (línea rosa); centrifugado sin dilución (línea azul); y sobrenadante del centrifugado (línea roja).

Para la preparación de los sustratos SERS soportados sobre papel de filtro de celulosa, inicialmente se evaluaron las condiciones más óptimas para la fabricación y para su posterior uso para la extracción de residuos de plaguicidas sobre las cáscaras de frutas y vegetales. Para ello, inicialmente se evaluó el tiempo de secado de los sustratos previo y posterior a la siembra de los plaguicidas. Adicionalmente, se decidió sumergir el papel en la suspensión concentrada de AgNSs en lugar de sembrar el papel con AgNSs, ya que de esa manera se puede asegurar mayor uniformidad del sustrato SERS. Para ello, se sumergió un trazo de papel de filtro de $\sim 3 \text{ cm}^2$ en la solución concentrada de AgNSs durante aproximadamente 10 segundos garantizando que todo el papel se humedezca de manera homogénea. Luego, se escurrió el papel con cuidado y se lo colocó sobre una superficie de vidrio para su secado parcial, teniendo la precaución de recubrirlo con papel aluminio debido a la facilidad de oxidación frente al aire. Luego de 10 min, el sustrato pierde suficiente agua de manera que se puede manipular el sustrato humedecido para recortar trozos más pequeños de $\sim 1 \text{ cm}^2$ y colocarlos en portaobjetos y fijarlos al vidrio con papel ojalillos (adhesivos circulares plastificados). Cabe mencionar que el sustrato resultó ser más eficiente en cuanto a las señales SERS obtenidas cuando se prepara en el momento de la medida, ya que las partículas en el papel se encuentran muy expuestas a sufrir oxidación. En la **Figura 5.15.** se puede observar los principales pasos del proceso de preparación de los sustratos SERS en papel de filtro.

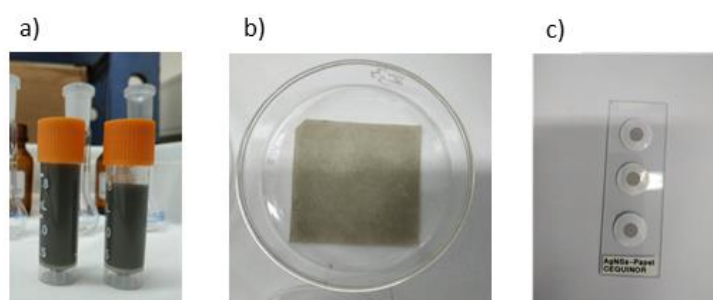


Figura 5.15.: Esquema del proceso de preparación de los sustratos SERS basados en AgNSs soportados en papel de filtro (*sustrato 2*); a) dispersión de AgNSs concentrada; b) papel de filtro luego de ser sumergido en la dispersión AgNSs; y c) sustrato SERS adherido al portaobjeto.

Al igual que los sustratos basados en nanopartículas inmovilizadas en gel de agar, los sustratos flexibles de celulosa también se caracterizaron mediante la técnica UV-Vis-DRS. Para ello, se recogieron espectros del *sustrato 2* con y sin AgNSs **Figura 5.16.**

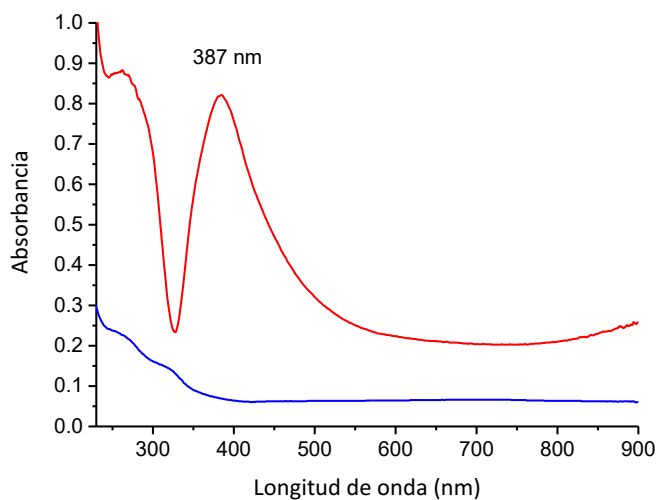


Figura 5.16.: Espectros de absorción UV-Vis DRS del *sustrato 2* del papel de filtro empleado para la preparación del sustrato (línea roja) y sin AgNSs (línea azul), ambos fueron tomados empleando como referencia BaSO₄.

5.4. Referencias

- [1] Ivanova, O. S. y Zamborini, F. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 70–72.
- [2] Garcia Leis, A.; Garcia-Ramos, J. V. y Sánchez Cortés, S. *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 7791–7795.
- [3] Li, M.; Zhao, Y.; Cui, M.; Wang, C. y Song, Q. *Anal. Sci.* **2016**, 32, 725–728.
- [4] Oliveira, M. J.; Quaresma, P.; de Almeida, M. P.; Araújo, A.; Pereira, E.; Fortunato, E.; Martins, R.; Franco, R. y Águas, H. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 2480.
- [5] Garcia-Leis, A.; Rivera-Arreba, I. y Sánchez Cortés, S. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, 535, 49–60.
- [6] Reyes Gómez, F.; Rubira, R.J.G.; Camacho, S. A.; Martin, C. B.; Da Silva, R.; Constantino, C. J. L; Alessio, P.; Oliveira, O.N. y Mejía-Salazar, J.R. *Sensors*. **2018**, 18, 3821–3830.
- [7] Platania, E.; Lofrumento, C.; Lottini, E.; Azzaro, E.; Ricci, M. y Becucci, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 6505–6514.
- [8] Aldeanueva-Potel, P.; Faoucher, E.; Álvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán L. M., y Brust, M. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 9233–9238.
- [9] Barbosa, S.; Agrawal, A.; Rodríguez-Lorenzo, L.; Pastoriza-Santos, I.; Álvarez-Puebla, R. A.; Kornowski, A.; Weller, H. y Liz-Marzán, L. M. *Langmuir*. **2010**, 26 (18), 14943–14950.

CAPÍTULO 6

EVALUACIÓN DE LA

EFICIENCIA SERS CON

AZUL DE METILENO

6.2. Introducción

El azul de metileno (MB, del inglés *methylene blue*) es un colorante catiónico (**Figura 6.1.**), ampliamente utilizado en la industria y en productos para el hogar. Además, es empleado como fármaco para tratamientos de isquemia, shock séptico y otras enfermedades [1,2]. Por otro lado, el MB es de uso común como molécula de prueba en estudios de espectroscopia SERS ya que el mismo presenta actividad SER(R)S conocida y permite determinar la eficiencia de los sustratos debido a sus grandes intensificaciones [3,4,5,6,7]. En este trabajo de Tesis, el MB fue empleado como molécula sonda para evaluar, cuando fue posible, la eficiencia de las plataformas SERS desarrolladas. Los resultados obtenidos del estudio del MB se presentan en este capítulo.

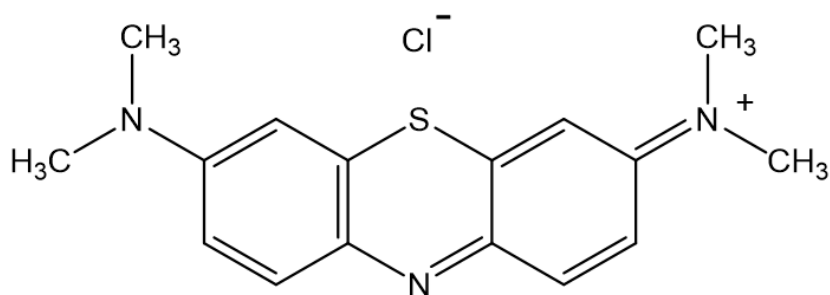


Figura 6.1.: Fórmula molecular del azul de metileno.

El MB es una molécula extensamente estudiada y reportada debido a sus propiedades químicas y sus usos en varias disciplinas. Una de las propiedades más estudiadas en la literatura es la capacidad de formar dímeros de manera reversible (ecuación 6.1.) donde la especie dominante, monómero o dímero, está determinada por factores tales como: concentración, temperatura, solventes, entre otras.



Las fluctuaciones observadas en las intensidades relativas de las bandas de MB presentes en los espectros UV-Vis, RRS y SER(R)S [8,9] han sido asociadas a la presencia de MB en forma de monómero y dímero. Del mismo modo, se han

reportado estudios de los efectos SERRS del MB adsorbido en plata en forma de monocapa y fueron estimadas posibles orientaciones del adsorbato sobre la superficie metálica [9,10,11,12]. Las bandas asociadas a la presencia dominante de dímeros y monómeros de MB se discutirán con más detalle más adelante en el capítulo.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos al evaluar los sustratos SERS preparados en este Trabajo de Tesis empleando al MB como molécula prueba. Antes de realizar los ensayos SERS, se caracterizó al MB por espectroscopia UV-Vis y FTIR.

6.3. Preparación de muestras

➤ Espectroscopia UV-Visible y FTIR

Previamente a las medidas de los espectros Raman y SERRS como se mencionó en el capítulo 4, se caracterizó el MB mediante técnicas espectroscópicas de rutina: espectroscopias UV-Vis y FTIR. Para ello, se preparó una solución de MB en etanol absoluto de $1,0 \times 10^{-5}$ M para realizar la medida del espectro UV-Vis en el rango de 210-900 nm. Para la obtención de los espectros FTIR se prepararon pastillas del analito en KBr para evaluar el espectro vibracional en el rango de $4000-400 \text{ cm}^{-1}$. En ambos casos, se tomaron los espectros correspondientes y posteriormente se compararon con los espectros reportados previamente en la literatura.

➤ Espectroscopia Raman y SERS

Con el objetivo de evaluar la capacidad SERS de los sustratos, se prepararon 10 soluciones de MB utilizando etanol absoluto como solvente. A partir de la solución madre de MB ($1,0 \times 10^{-2}$ M), se prepararon distintas soluciones de diferentes concentraciones por diluciones sucesivas ($1,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-9}$ y $1,0 \times 10^{-10}$ M) (**Figura 6.2.**). Adicionalmente se prepararon capilares sellados del solvente utilizado y del compuesto sólido con el fin de estudiar los espectros Raman en ambos casos.

Para evaluar el sustrato SERS basado en AgNPs inmovilizadas en gel agar, se colocó un volumen de 10,0 μL de cada solución de MB, preparadas en el mismo día, en

diferentes geles de agar de 1 cm² (con una altura de ~ 0,5 cm); los mismos, fueron colocados en portaobjetos de microscopio (**Figura 6.2.a**). Posteriormente, los geles se dejaron deshidratar completamente a temperatura ambiente protegidos de la luz durante aproximadamente 24 h. Además, para examinar el blanco o fondo del sustrato, se colocó 10,0 µL de etanol sobre un sustrato y luego se dejó deshidratar 24 h. Para el estudio del segundo sustrato, basado en AgNSs impregnadas sobre papel de filtro de celulosa, se colocó 10,0 µL de las diferentes concentraciones del analito sobre el sustrato y posteriormente se dejaron secar durante ~ 1 h al abrigo de la luz antes de coleccionar los espectros SERS (**Figura 6.2.b**). En ambos sustratos se coleccionaron al menos 5 spots para cada una de las concentraciones evaluadas.

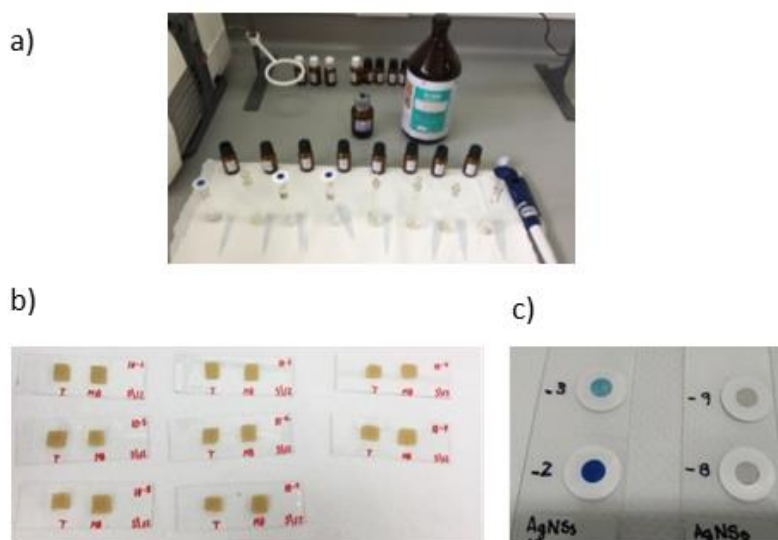


Figura 6.2.: a) Preparación de soluciones de diferentes concentraciones de MB en etanol b) Sustratos SERS basados en AgNPs inmovilizadas en gel agar sin contaminar e hidratados c) Preparación de sustrato SERS basados en AgNSs sobre papel de filtro de celulosa contaminado con MB.

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. Espectroscopia UV-Vis

En la **Figura 6.3.** se muestra el espectro UV-Vis obtenido de la solución etanólica de MB ($1,0 \times 10^{-5}$ M), en el que se observan las principales bandas

características del analito centradas en ~ 246, 292 y 655 nm, con un pequeño hombro alrededor de 610 nm, lo que concuerda con el espectro electrónico del MB reportado en la literatura [11]. Puede concluirse, a partir de la comparación con datos de literatura, que en estas condiciones de trabajo el analito se encuentra mayoritariamente en forma monomérica.

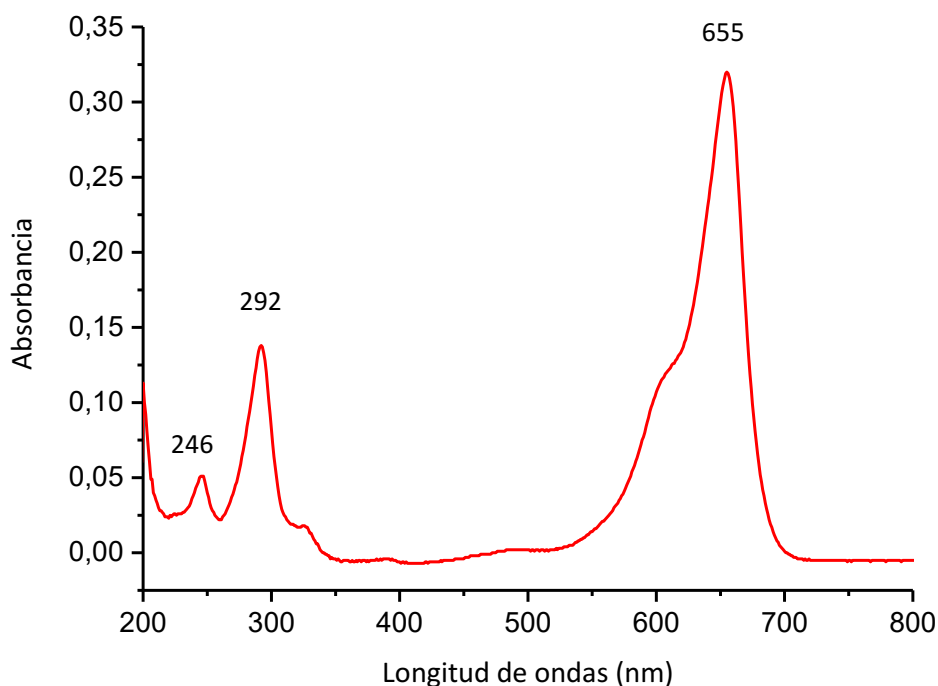


Figura 6.3.: Espectro de absorción UV-Vis de una solución etanólica de MB $1,0 \times 10^{-5}$ M (celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico).

Según lo informado por varios autores [8,13], las intensidades relativas de las bandas de los espectros absorción UV-Vis alrededor de 655 nm y el hombro en ~ 610 nm, se encuentra determinado por la concentración de analito. A bajas concentraciones de MB ($\sim 1,0 \times 10^{-5}$ M) y a temperatura ambiente, se produce un incremento en la intensidad de la banda presente a ~ 655 nm, asociada a la especie monomérica, debido a que es esta la especie predominante, mientras que a mayores concentraciones se incrementa en mayor medida la banda presente a ~ 600 nm debido a la formación de dímeros de MB [13,14].

Como se mencionó anteriormente, el espectro electrónico de un analito aporta información sobre posibles efectos Raman de resonancia o preresonancia que pueden tener lugar según la longitud de onda del láser de excitación empleado. En este caso, según el espectro UV-Vis de absorción de MB, se espera que tanto la especie monomérica como los dímeros de MB que absorben en la cercanía del rango de longitud de onda del láser de Kr^+ exhiban efecto Raman resonante o SERRS [9].

6.4.2. Espectroscopia FTIR

En la **Figura 6.4.** se muestra parte del espectro FTIR del MB tomado en la región $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. En la **Tabla 6.1.** presentada en la próxima sección se muestran de manera conjunta las bandas principales FTIR y RR de la molécula de MB obtenidas experimentalmente con las asignaciones tentativas realizadas a partir de bibliografía previamente reportada.

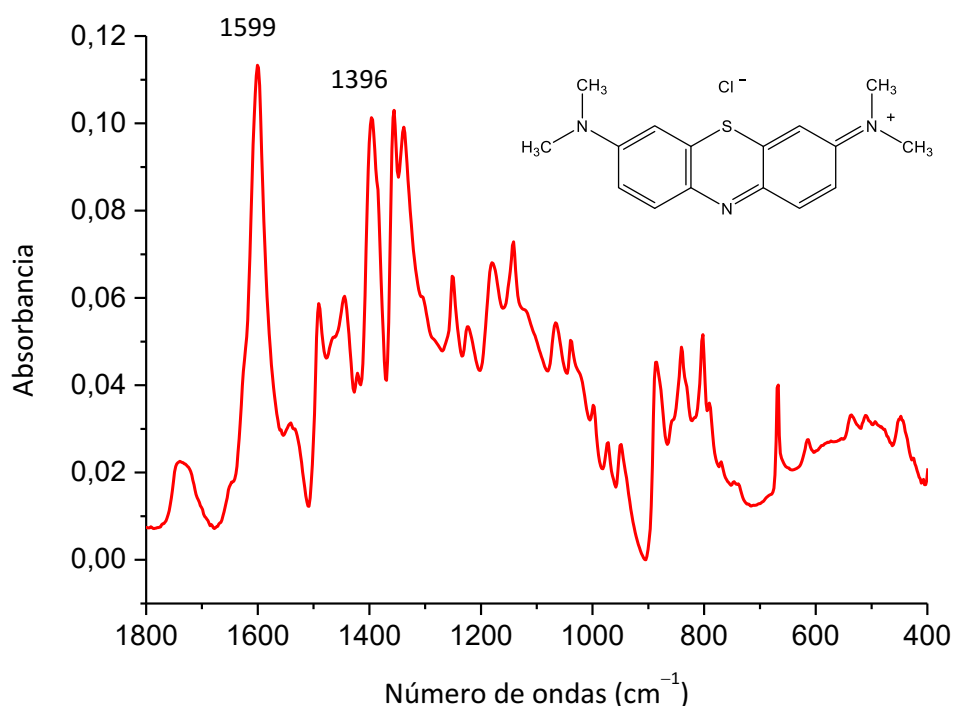


Figura 6.4.: Espectro FTIR del MB sólido en la región de $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Barridos: 64; Resolución: 4 cm^{-1} .

6.4.3. Espectroscopia Raman y SERRS

Previamente a la evaluación de los sustratos SERS, se tomaron los espectros Raman del sólido de MB y del solvente que se empleó para la preparación de las soluciones de MB, en ambos casos en capilares sellados a la llama. Las medidas Raman se llevaron a cabo empleando el objetivo de 10x (0,25 NA) y las muestras fueron excitadas empleando el láser rojo de 647,1 nm a una potencia de salida del láser de 100 mW. En la **Figura 6.5.** se puede ver el espectro Raman normal del MB sólido; el mismo coincide con los espectros Raman previamente reportados [8] donde se observan las bandas más intensas en a $\sim 1628, 1396, 772, 594, 500$ y 460 cm^{-1} . Los picos señalados a ~ 460 y 500 cm^{-1} fueron atribuidos a los modos de deformación en el plano del C–N–C, donde C se refiere a los carbonos de los grupos metilo, y la banda presente a 1396 cm^{-1} fue asignada principalmente al estiramiento del enlace C–N unido directamente a los grupos metilos de la molécula [11]. La banda observada a $\sim 1622 \text{ cm}^{-1}$ se encuentra asignada en la literatura a las vibraciones $\nu(\text{C–C})$ y $\nu(\text{C–N})$ del anillo. Los resultados descritos anteriormente, junto con la literatura consultada [8], permitió caracterizar la molécula de MB mediante su estructura vibracional.

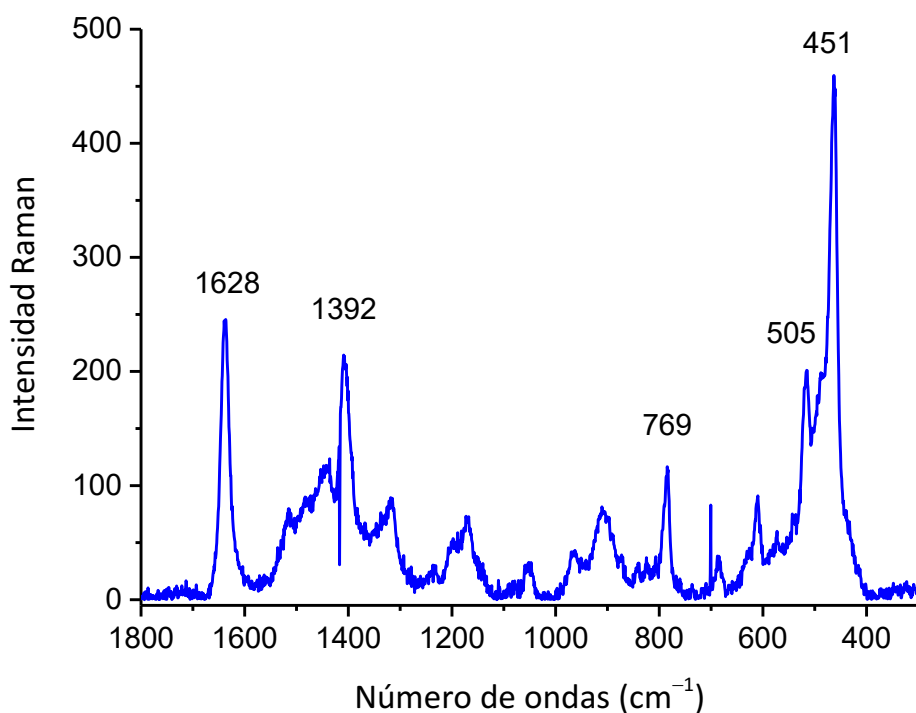


Figura 6.5.: Espectro Raman normal de MB sólido. Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; Potencia de salida del láser: 100 mW; Tiempo de adquisición: 10 s; 16 acumulaciones; Objetivo de 10x (0,25 NA).

Tabla 6.1.: Números de ondas obtenidos experimentalmente del espectro FTIR y RRS de MB y sus asignaciones según trabajos previos reportados.

Numero de ondas (cm ⁻¹)				Asignación ^c [8]
FTIR experimental	FTIR reportado ^a [8]	RRS Experimental	RRS Reportado ^b [8]	
	1625	1628	1625	v (C-C) _{anillo} ; v (C-N) _{anillo}
1599	1599		1601	v (C-C) _{anillo} ; v (C-N) _{anillo}
1541	1541		1543	v (C9-N10)

1490	1494		1496	δ (CH ₂)
1445	1447		1445	δ (N-C-H) _{AMG}
1420	1422		1422	δ (N-C-H)
1396	1394	1396	1390	ν (C9-N10); ν (C3-N2)
1356	1357		1356	ν (C-C) _{anillo} ; β (CH)
1337	1336		1336	ν (C-N) _{anillo} ; ν (C-N) _{AMG}
1303	1302	1305	1300	β (CH); ν (C-N)
1250	1254		1255	β (CH)
1223	1218		1222	β (CH)
1181	1177	1181	1179	ρ (CH ₃)
1141	1146		1147	β (CH)
1065	1066	1052	1066	γ (CH ₂)
1040	1040	1042	1035	β (CH); ν (C-S)
949	947	954	948	ρ (CH ₂)
858	859		858	δ (C-C-C) _{anillo} ; δ (C-N-C)
840	838			γ (C-H) _{anillo}
802	805		805	γ (C-H) _{anillo}
791	789		792	ν (C-S) _{anillo}
770	769	772	772	ν (C-N) _{AMG}
668	669	672	669	δ (C-C-C) _{anillo}
614	611	600		γ (C-H) _{anillo}

537	532			δ (C–N–C)
509	513	505		δ (C–N–C)
449	447	451	450	δ (C–N–C)

ν = estiramiento, δ = deformación en el plano; γ deformación fuera del plano; AMG: unido directamente a los grupos metilos.

^a Números de ondas de FTIR sólido ^b RRS de MB en solución acuosa (0,1 M) ^c Frecuencias vibracionales Raman de la molécula MB estimado en medio acuoso B3LYP/6-311++G (d, p) [8].

Sustrato 1: Gel agar-AgNPs

Para evaluar el primer sustrato SERS desarrollado inicialmente se midió el espectro SERS del mismo sin analito empleando como fuente la línea de excitación de 647,1 nm. El espectro del gel de agar con AgNPs deshidratado (sin analito) presentó una ventana espectral limpia en la región de ~ 3500 - 250 cm^{-1} (**Figura 6.6.**), lo cual concuerda con la baja actividad Raman de los polisacáridos que componen el sustrato [15]. La banda intensa observada a $\sim 225 \text{ cm}^{-1}$ puede ser atribuida al modo de vibración Ag–O [16], la que estuvo presente en todos los espectros recolectados (con y sin analito) y su intensidad se fue incrementando cuando el sustrato se expuso en mayor medida a la radiación láser y/o al aire.

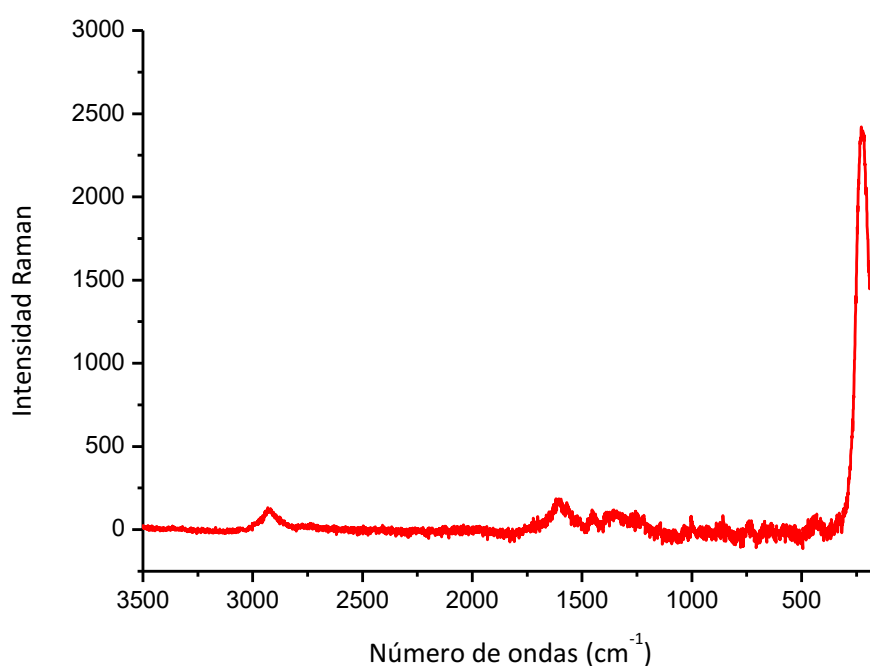


Figura 6.6.: Espectro Raman del *sustrato 1* gel agar AgNPs deshidratado. Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; Potencia del láser: 100 mW; Tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; Objetivo de 50x (0,75 NA).

Como se describió anteriormente en la sección experimental, se sembraron 10,0 μL de diferentes soluciones del MB con concentraciones entre $1,0 \times 10^{-2}$ y $1,0 \times 10^{-10}$ M sobre $\sim 1 \text{ cm}^2$ de los sustratos. Luego de la evaporación del solvente y la deshidratación de los geles ($\sim 24 \text{ h}$), se procedió a coleccionar los espectros SERS utilizando la línea de excitación roja (647,1 nm). Es importante remarcar que, a medida que el gel se fue deshidratando las señales SERS fueron incrementándose, fenómeno que fue descrito anteriormente [15] y se atribuyó a la formación de los puntos calientes (*hot spots*) dinámicos por las agregaciones de AgNPs y, en consecuencia, a la intensificación del campo electromagnético.

El azul de metileno presenta una fuerte absorción electrónica a $\sim 650 \text{ nm}$, por lo que el empleo de la línea de excitación de 647,1 nm proporcionada por el láser Kr^+ permitió realizar experimentos SERRS, logrando grandes intensificaciones debido a que algunas de las señales Raman de MB se intensifican por resonancia con la excitación electrónica y adicionalmente a ello por el efecto de la superficie metálica. En la **Figura 6.7.** se muestran los espectros SERRS para diferentes concentraciones superficiales de

MB sobre los sustratos medidos luego de que los mismos se encuentren deshidratados. No fue posible observar ninguna señal para la solución más diluida empleada ($1,0 \times 10^{-10}$ M).

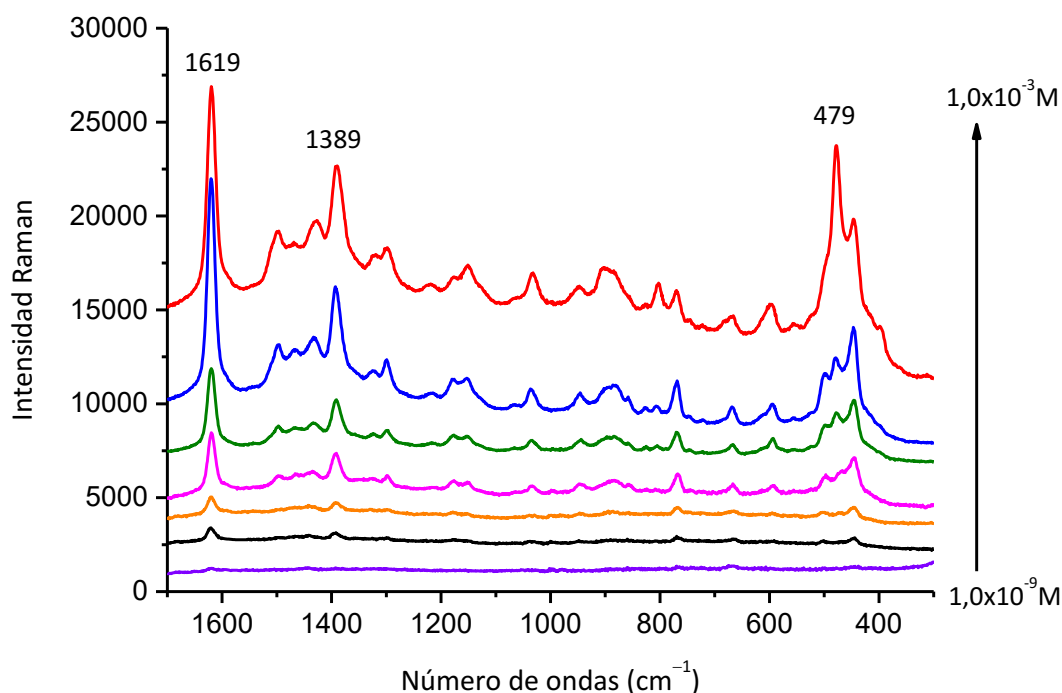


Figura 6.7.: Espectros SERRS representativos de azul de metileno obtenidos con el sustrato AgNPs gel de agar. Longitud de onda de excitación del láser: 647,1 nm; Potencia de salida del láser: 100 mW ($\sim 1,5$ mW sobre la muestra); tiempo de adquisición: 1 s para las soluciones de $1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ M y 10 s para las soluciones $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-9}$ M; 4 acumulaciones; objetivo de 50x (0,75 NA). Espectros con corrección de línea de base.

La banda Raman más intensa observada en el espectro SERRS a ~ 1619 cm⁻¹ ha sido previamente asignada a estiramientos $\nu(\text{C-C})$ y $\nu(\text{C-N})$ del monómero MB [8]. Durante la colecta de los espectros SERS se observaron fluctuaciones en las señales comprendidas en la región de 600-300 cm⁻¹ que pueden atribuirse al equilibrio monómero-dímero [8,9,11]. Debido a lo mencionado, se seleccionó la señal más intensa y definida del espectro, banda centrada a ~ 1619 cm⁻¹ y se construyó una curva de calibración; para ello se midió la altura de dicha banda para al menos 5 de los *spots* medidos para cada una de las concentraciones y se graficó la intensidad

promedio en función de la concentración superficial del analito sobre el sustrato (**Figura 6.8.**). Dado que la intensidad de SERS es proporcional al número de moléculas adsorbidas en el sustrato, el gráfico presentado en la **Figura 6.8.** puede considerarse como una isoterma de adsorción [17,18]. La muestra más concentrada fue excluida para el ajuste ya que las señales SERRS permanecen sin cambios con respecto al punto anterior sugiriendo la saturación del sustrato. Es importante señalar, que la calibración (altura del pico frente a la concentración superficial) de MB se realizó empleando las intensidades de las bandas medidas mediante la altura del pico y el área, ya que presenta una banda intensa y aguda en $\sim 1619 \text{ cm}^{-1}$. Sin embargo, en los capítulos posteriores las curvas de calibraciones fueron realizadas teniendo en cuenta las áreas de las bandas correspondientes para cada uno de los casos.

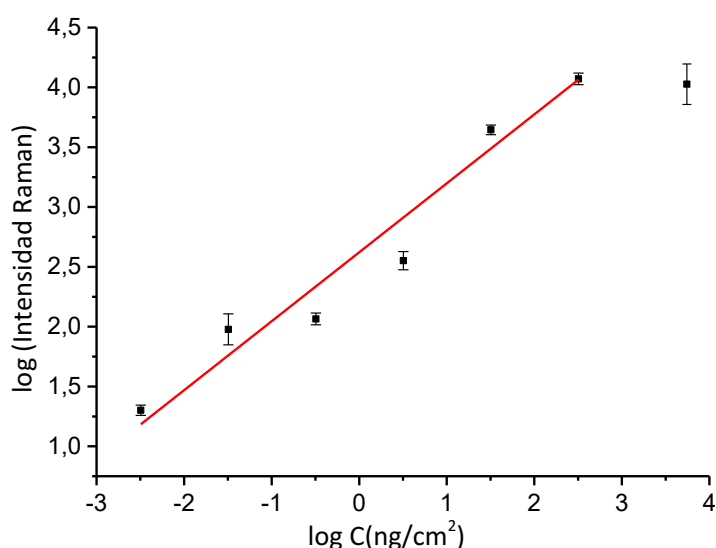


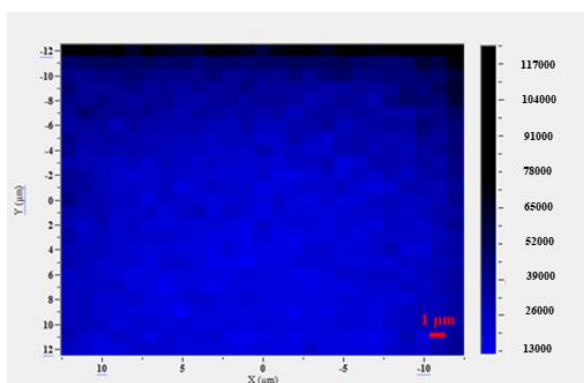
Figura 6.8.: Dependencia de la intensidad SERRS de MB medida en $\sim 1619 \text{ cm}^{-1}$ (altura del pico) con la concentración superficial de MB (ng/cm^2) en el sustrato de AgNPs en gel de agar. Los puntos corresponden al promedio de cinco mediciones en diferentes spots y las barras de error indican la desviación estándar para cada concentración. Ajuste lineal: $\log I = 2,622 (\pm 0,095) + 0,576 (\pm 0,051) \log C$; $R^2 = 0,96$.

La desviación estándar para cada concentración se indica en la figura mediante las barras de error, los datos fueron ajustados mediante un ajuste lineal ($R^2 = 0,96$) en el rango de $1,0 \times 10^{-4}$ de $1,0 \times 10^{-10}$ de las soluciones de MB. La mínima concentración

superficial detectada para el MB empleando el sustrato AgNP gel de agar con la línea de excitación de 647,1 nm fue de $\sim 3 \text{ pg/cm}^2$, lo que corresponde a aproximadamente 60 moléculas/spot considerando que el tamaño del punto láser es de aproximadamente $1 \text{ }\mu\text{m}^2$ [19,20]. Adicionalmente, se midieron espectros SERS empleando la longitud de onda de excitación de 514,5 nm, obteniendo resultados inferiores con respecto a la longitud de onda de excitación de 647,1 nm, ya que no fue posible observar los espectros Raman después del tratamiento del sustrato con soluciones de concentraciones inferiores a $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$. Este efecto se atribuye a que la luz verde se encuentra fuera de la resonancia de excitación electrónica del MB.

Para determinar la uniformidad del *sustrato 1* se llevaron a cabo mapeos SERRS. Para ello, se sembró 1 cm^2 de sustrato de gel de agar con $20,0 \text{ }\mu\text{l}$ de solución etanólica de concentración $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ de MB y se dejó secar al abrigo de la luz durante 24 h. Posteriormente a su deshidratación, se midieron mapas SERRS del sustrato empleando el láser de 647,1 nm, que consistieron en la toma de 625 espectros SERRS del MB (mapa de $25 \times 25 \text{ }\mu\text{m}$ de área de sustrato, tomados cada $1 \text{ }\mu\text{m}$). En la **Figura 6.9.a** se muestra uno de los mapas colectados para el MB y en la **Figura 6.9. b.** se observa la representación del histograma para los 625 puntos del mapa, presentando un área promedio de $29290 \pm 13681 \text{ a.u.}$ integrada para la banda en $\sim 1619 \text{ cm}^{-1}$ entre 1700 y 1570 cm^{-1} del MB. En las **Figura 6.9.a y b** se observa cómo las intensidades del MB fueron decayendo a medida que el láser fue recorriendo la superficie del sustrato, dando lugar a señales menos intensas comparadas principalmente con las intensidades medidas en la primera línea del mapeo SERRS. Este efecto podría ser atribuido a la exposición continua de la muestra al láser de excitación, lo que conlleva a un calentamiento continuo del gel provocando daños sobre la muestra y de este modo reduciendo las intensidades SERRS del MB [21]. Sin embargo, como se observa en el mapa y en su histograma existe una uniformidad relativa de MB sobre el *sustrato 1*, ya que la gran mayoría de los spots colectados del mapa SERRS presentan intensidades comparables, permitiendo garantizar resultados confiables de las medidas SERRS mediante la toma y análisis de una pequeña cantidad de spots recolectados.

a)



b)

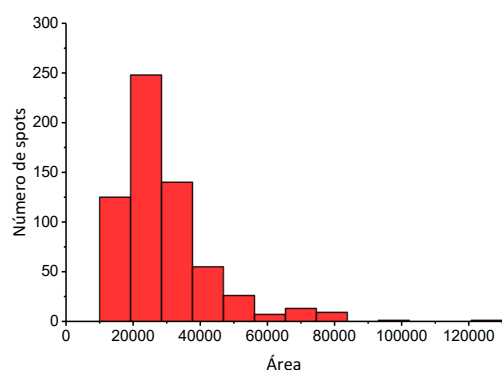


Figura 6.9.: a) Mapa de 25 x 25 μm de área del *sustrato 1* sembrado con 10,0 μl de solución etanólica de concentración $1,0 \times 10^{-5}$ M de MB (**Figura 6.9.a**). El área de cada espectro fue integrada para la banda en ~ 1619 cm^{-1} entre 1700 y 1570 cm^{-1} b) Representación del histograma para los 625 puntos del mapa con un área promedio de 29290 ± 13681 a.u. Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición 1 s; 2 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA), espectros tomados cada 1 μm .

Como se mencionó anteriormente, durante la toma de los espectros SERRS de MB se observaron fluctuaciones en las intensidades relativas de las señales en la región espectral 600-300 cm^{-1} , que puede atribuirse al calentamiento local del láser, que promueve el aumento y disminución de la concentración superficial relativa de monómeros de MB acompañado de cambios de adsorciones del MB sobre la superficie de plata. A medida que el analito absorbe fotones, esto provoca un incremento en la temperatura local y como consecuencia la desorción de especies de MB en forma de dímeros, lo que resulta en un aumento de la intensidad relativa de la banda ubicada en 479 cm^{-1} asociada al monómero con respecto a las bandas en ~ 449 y 502 cm^{-1} asignadas a dímeros del MB [9,11]. Este fenómeno se observa al cambiar el sitio de la superficie del sustrato a medir (spot), es decir, se recupera la concentración superficial original o inicial y las intensidades relativas de las mismas al variar el spot o las coordenadas XY. En la **Figura 6.10.** se muestran espectros SERRS del MB con una misma concentración superficial ($1,0 \times 10^{-4}$ M) sobre un sustrato AgNPs de gel de agar

deshidratado donde se observan cambios en las intensidades relativas de las bandas antes mencionadas en la región espectral de $\sim 600\text{-}300\text{ cm}^{-1}$ al modificar el spot.

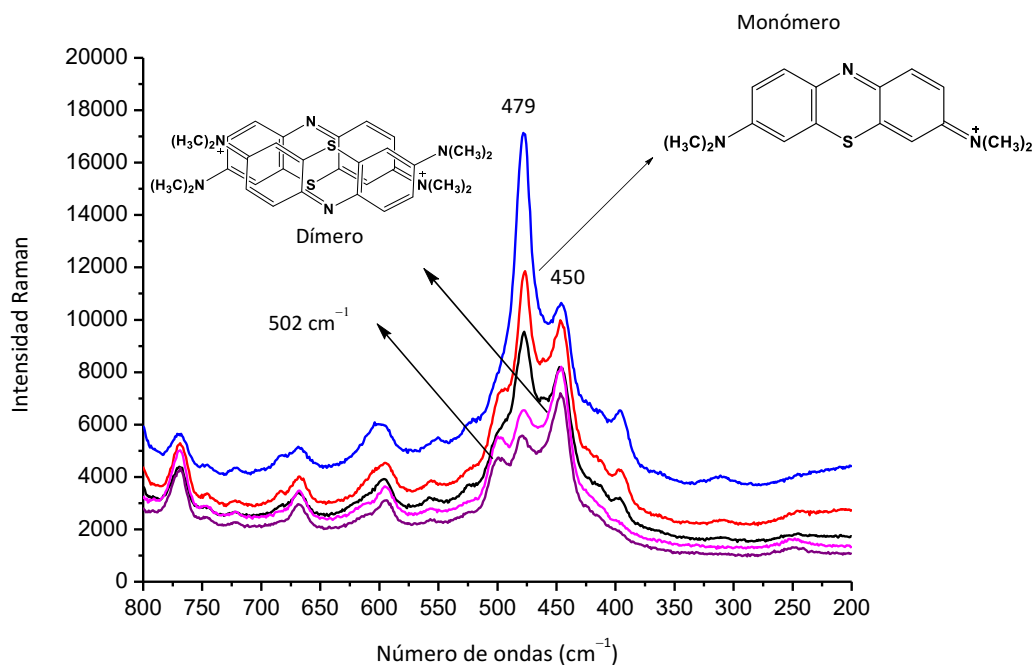


Figura 6.10.: Espectros SERRS de MB conteniendo $1,0 \times 10^{-4}\text{ M}$ sobre el sustrato AgNPs de gel de agar deshidratado donde se observan cambios en las intensidades relativas de las señales en la región de $600\text{-}300\text{ cm}^{-1}$ al modificar el spot. Longitud de onda de excitación del láser: $647,1\text{ nm}$; Potencia del láser: 100 mW ($\sim 1,5\text{ mW}$ sobre la muestra); 4 acumulaciones, tiempo de adquisición: 1 s ; objetivo de $50\times$ ($0,75\text{ NA}$).

Continuando con los cambios observados en las bandas de MB asociadas a las especies en forma de monómero o dímero, como se mencionó en el capítulo 4 se ha trabajado con la celda Linkam (accesorio Raman) que permite operar a diferentes temperaturas (20 a $-160\text{ }^\circ\text{C}$) para estudiar el MB. Si bien no será profundizado en esta Tesis, se expondrán algunos de los resultados preliminares obtenidos. Para estudiar los cambios de temperatura del MB se preparó un gel de agar con $1,0 \times 10^{-5}\text{ M}$ de MB y luego de su deshidratación se tomaron espectros SERRS con la celda Linkam empleando una rampa de temperatura en el rango de 20 a $-160\text{ }^\circ\text{C}$ a una velocidad de $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Como ya se mencionó, en los espectros SERRS del MB se observan cambios en las intensidades relativas de las bandas que se encuentran asociadas con las

distintas especies de MB. Uno de los factores que modifican las poblaciones relativas de monómero o dímero adsorbidas sobre la superficie nanoestructura es la temperatura [9,10,11]. En la **Figura 6.11.** se muestran los espectros SERRS del MB ($1,0 \times 10^{-5}$ M) obtenidos a diferentes temperaturas de trabajo empleando la celda Linkam. De manera opuesta al efecto observado por el aumento de temperatura por el láser de excitación sobre la muestra (gel de agar sembrado con MB), en el que se observa que la especie predominante está en forma de monómero, esta experiencia permite poner en evidencia que a bajas temperaturas la especie dominante según las asignaciones de las bandas ~ 449 y 502 cm^{-1} es el dímero de MB. Esto concuerda con lo previamente reportado en la literatura [9,11]. Si bien, estos son resultados de estudios preliminares existe todavía grandes interrogantes que quedan por ser explorados e interpretados, que se encuentran fuera del alcance de los objetivos de esta Tesis, pero que forman parte de futuros trabajos por parte de nuestro grupo de investigación.

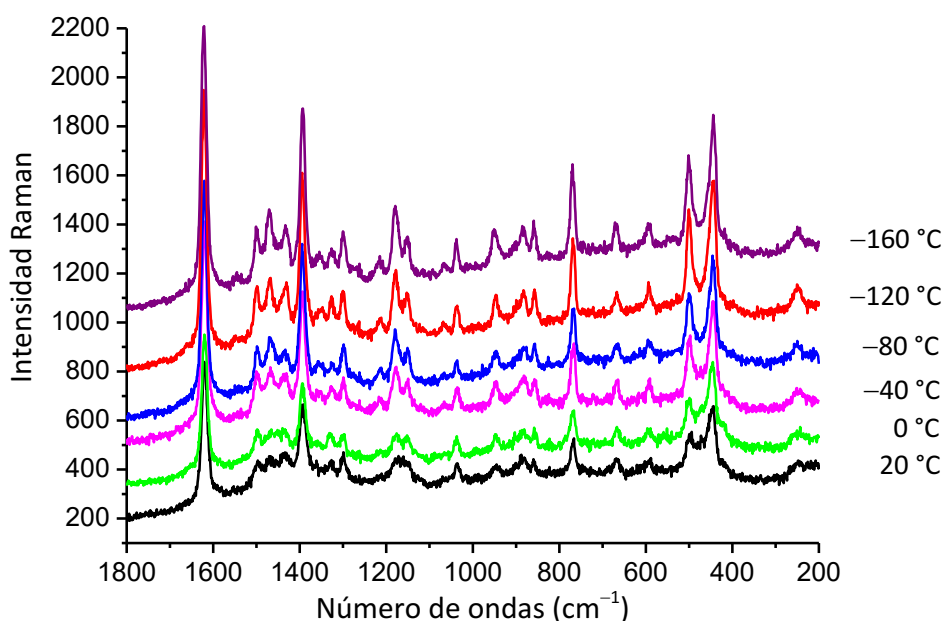


Figura 6.11.: Espectros SERRS del MB ($1,0 \times 10^{-5}$ M) obtenidos de *sustrato 1* a diferentes temperaturas de trabajo (20 a -160 °C) empleando la celda Linkam. Longitud de onda de excitación del láser: 647,1 nm; Potencia del láser: 200 mW; 4 acumulaciones, tiempo de adquisición: 1 s; objetivo de 50x (0,75 NA). Las medidas se realizan con objetivo de larga distancia focal (LWD) 50x (0,5 NA).

Sustrato 2: Papel de filtro-AgNSs

De la misma manera antes mencionada se intentó evaluar la eficiencia del segundo sustrato flexible desarrollado formado por AgNSs soportado sobre papel de filtro de celulosa (*sustrato 2*). Sin embargo, no fue posible obtener señales del analito en estas condiciones debido a la presencia de fluorescencia del MB. Por esta razón, el *sustrato 2* se evaluó directamente frente a los fungicidas, como se hará referencia en los capítulos posteriores.

6.5. Conclusiones

Inicialmente se caracterizó el azul de metileno mediante los espectros de absorción UV-Vis de una solución en etanol diluida de MB ($1,0 \times 10^{-5}$ M) permitiendo identificar en base a trabajos previos, al monómero del MB como la especie predominante, debido al incremento relativo de la banda de absorción a ~ 655 nm con respecto a la nada a ~ 600 nm. Además, mediante esta técnica fue posible seleccionar la longitud de onda de excitación del láser que posteriormente nos permitió realizar experimentos RRS y SERRS, ya que tanto los monómeros como dímeros del MB absorben en la cercanía del láser rojo (647,1 nm).

En cuanto a los estudios SERRS de MB, en una primera instancia se evaluó el sustrato SERS basado en nanopartículas de plata inmovilizadas en gel de agar. Se observó un incremento de las señales SERRS en el sustrato desarrollado cuando el sustrato de gel de agar se encontraba completamente deshidratado, lo que se asoció a la agregación de las AgNPs en el gel de agar [15]. Adicionalmente, se logró realizar una curva de calibración SERRS logrando un ajuste lineal ($R^2 = 0,96$) empleando los sustratos de ~ 1 cm² con diferentes concentraciones superficiales de MB ($1,0 \times 10^{-2}$ a $1,0 \times 10^{-10}$ M) alcanzando a detectar concentraciones superficiales de ~ 3 pg/cm² ($1,0 \times 10^{-9}$ M) lo que corresponde a aproximadamente 60 moléculas/spots considerando que el tamaño del punto láser es de aproximadamente 1 μ m². Por último, se determinó la homogeneidad del sustrato SERS desarrollado mediante el análisis de mapas SERRS conteniendo la molécula de prueba, permitiendo garantizar resultados confiables de las medidas SERS mediante la toma y análisis de una pequeña cantidad de spots recolectados.

Se han observado cambio en los espectros SERRS de la molécula de MB con las concentraciones y con la temperatura lo que han sido asociados a cambios en las poblaciones relativas de especies en forma de monómero o dímeros de MB en la superficie metálica. Estos cambios se han logrado seguir mediante las intensidades relativas de las bandas, principalmente la banda de 479 cm^{-1} lo cual fue asociada al monómero y las bandas en ~ 449 y 502 cm^{-1} asignadas para el MB en forma de dímeros [9,11].

En cuanto a la evaluación del sustrato SERS basado en AgNSs soportados en papel de filtro de celulosa, no fue posible obtener señales SERS de MB ya que el mismo presentó mucha fluorescencia con el empleo de las líneas de los láseres disponibles. Por este motivo se decidió determinar la eficiencia del *sustrato 2* frente a los plaguicidas, detallado en los capítulos siguientes.

6.6. Referencias

- [1] Oz, M.; Lorke, D. E.; Hasan, M. y Petroianu, G. A. *Med. Res. Rev.* **2010**, 31 (1), 93–117.
- [2] Andresen, M.; Dougnac, A.; Diaz, O.; Hernandez, G. y Castillo, L. *J. Crit. Care.* **1998**, 13 (4), 164–168.
- [3] Laurent, G.; Felidj, N.; Aubard, J. y Levi, G. *Phys. Rev. B* **2005**, 71, 045430, 1–6.
- [4] Merlen, A.; Chevallier, V.; Valmalette, J. C.; Patrone, L.; Torchio, P.; Vedraïne, S.; Flory, F. y Moula, G. *Surf. Sci.* **2011**, 605, 1214–1218.
- [5] Sivapalan, S. T.; DeVetter, B. M.; Yang, T.; Schulmerich, M. V.; Bhargava, M. V.; y Murphy, J.C. J. *Phys. Chem. C.* **2013**, 117 (20), 10677–10682.
- [6] Stiufiuc, R.; Lacovita, C.; Lucaciu, C. M.; Stiufiuc, G.; Dutu, A. G.; Braescu, C. y Leopold, N. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, 8, 47.
- [7] Picone, A. L.; Della Védova, C. O. y Romano, R. M. *Vib. Spectrosc.* **2020**, 110, 103136.
- [8] Dutta Roy, S.; Ghosh, M; Chowdhury, J. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, 46, 451–461.
- [9] Nicolai, S. H. A. y Rubim, J. C. *Langmuir.* **2003**, 19, 4291–4294.
- [10] Rubim, J. C.; Sousa, M. H.; Silva, J. C. O. y Tourinho, F. A. *Braz. J. Phys.* **2001**, 31,3, 402–408.
- [11] Tognalli, N. G.; Fainstein, A.; Vericat, C.; Vela, M. E. y Salvarezza, R. C. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 354–360.
- [12] Fateixa, S.; Wilhelm, M.; Jorge, A. M.; Nogueiraa, H. I. S. y Trindadea, T. *J. Raman Spectrosc.* **2017**, 48, 795–802.
- [13] Rabinowitch E. y Epstein L. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 69–78.
- [14] Pamcanyrt, C. y Boniface, C. *Spectrochim. Acta A.* **1993**, 49 (12), 1715–1725.
- [15] Aldeanueva-Potel, P.; Faoucher, E.; Álvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán L. M., y Brust. M. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 9233–9238.
- [16] Mdluli, P. S.; Sosibo, N. M.; Revaprasadu, N.; Karamanis, P. y Leszczynski, J. *J. Mol. Struct.* **2009**, 935(1–3), 32–38.
- [17] De Oliveira, K. V.; Rubim, J. C. *Vib. Spectrosc.* **2016**, 86, 290–301.

[18] Souza, M. A.; De Oliveira, K. V.; Oliveira, F. C. C.; Silva, L. P.; y Rubim, J. C. *Vib. Spectrosc.* **2018**, 152–157.

[19] Horiba scientific.

<https://www.horiba.com/int/scientific/technologies/raman-imaging-and-spectroscopy/raman-analysis/>. Consultado noviembre 2022.

[20] Tobon, Y. A.; Seng, S.; Picone, A. L.; Bava, Y. B.; Juncal, L. C.; Moreau, M.; Romano, R. M.; Barbillat, J. y Sobanska, S. *J. Raman Spectrosc.* **2017**, 1135–1137.

[21] Viets, C. y Hill, W. *J. Phys. Chem. B.* **2001**, 105, 6330–6336.

CAPÍTULO 7

TIRAM

7.2. Introducción

Como fue mencionado en el capítulo 3, el tiram (**Figura 7.1.**) es un fungicida de la familia de los ditiocarbamatos empleado comúnmente en frutas y vegetales de modo preventivo frente a enfermedades causadas por hongos [1]. En este sentido, a lo largo de esta sección se presentará el estudio realizado para este compuesto, partiendo desde su identificación hasta su detección en las cáscaras de frutas y vegetales. En la **Tabla 7.1.** se proporcionan los límites máximos de residuos (LMR) de este plaguicida en las frutas y vegetales estudiados en esta Tesis establecidas tanto por los organismos nacionales como internacionales [2,3,4].

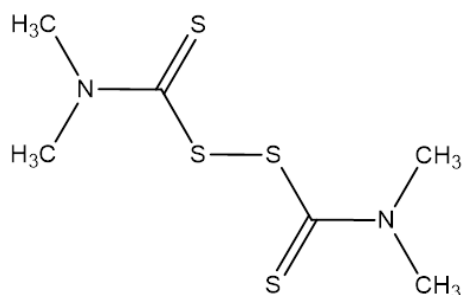


Figura 7.1.: Estructura molecular del fungicida tiram.

Tabla 7.1.: Valores establecidos como LMR para el plaguicida Tiram según diferentes organismos.

Fruta y vegetales	SENASA (mg/Kg)	EPA (mg/Kg)	UNION EUROPEA (mg/Kg)
Manzana	2	7	5
Morrón	Exento	-	0,1
Frutilla	3	7	10
Tomate	3	-	-
Berenjena	Exento	-	-
Cereza	1	-	-

7.3. Preparación de muestras

➤ Espectroscopia UV-Visible y FTIR

Para caracterizar al tiram se estudió el compuesto empleando las técnicas espectroscópicas UV-Vis y FTIR. Para la toma del espectro UV-Vis, se preparó una solución de tiram de $1,0 \times 10^{-5}$ M en etanol y los espectros fueron colectados en el rango de 210-900 nm. Para las medidas de los espectros FTIR fueron preparadas pastillas de KBr con tiram para su estudio en la región de $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ y pastillas de polietileno con tiram para la zona más baja $600-100 \text{ cm}^{-1}$. Los espectros obtenidos de UV-vis como FTIR se emplearon de modo comparativo con información previamente informada para la identificación del plaguicida y el espectro UV-Vis se empleó para determinar si se esperaba que el analito presente el fenómeno de SERRS.

➤ Espectroscopia Raman y SERS

Se preparó una solución madre $1,0 \times 10^{-2}$ M de tiram utilizando acetona como solvente, y a partir de dicha solución por diluciones sucesivas se prepararon diferentes soluciones de tiram de las siguientes concentraciones: $1,0 \times 10^{-3}$, $4,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-8}$, $2,0 \times 10^{-9}$, $1,0 \times 10^{-9}$ y $1,0 \times 10^{-10}$ M. Las soluciones se prepararon en el mismo día de la utilización de las mismas. Para la obtención de los espectros Raman normales de tiram, se preparó un capilar del polvo del plaguicida y se selló a la llama; del mismo modo se preparó la muestra del solvente empleado para preparar las soluciones de tiram (**Figura 7.2.**).



Figura 7.2.: Preparación de soluciones de tiram por diluciones sucesivas. Las mismas se preparan para ser empleadas en el día de la preparación de muestras únicamente

Para evaluar la efectividad de los sustratos SERS basados en AgNPs inmovilizados en gel de agar (*sustrato 1*) en la detección de tiram, se procedió del mismo modo que se mencionó en el capítulo precedente con el MB. Es decir, se cortaron los geles de agar conteniendo AgNPs de 1 cm^2 (con una altura de $\sim 0,5 \text{ cm}$) y se contaminó con $10,0 \mu\text{L}$ de distintas soluciones de tiram preparadas en el día; posteriormente se colocaron en portaobjetos de microscopio y se dejaron deshidratar al abrigo de la luz durante $\sim 24 \text{ h}$ (**Figura 7.3.**). Por otro lado, se prepararon las muestras para ser analizadas por espectroscopia SERS del segundo sustrato SERS flexible desarrollado, formado por AgNSs impregnadas sobre papel de filtro de celulosa (*sustrato 2*). Para ello, se sembraron $10,0 \mu\text{L}$ de las distintas soluciones de tiram sobre 1 cm^2 del sustrato y se dejó secar durante 1 h previo a la toma de los espectros SERS (**Figura 7.4.**).

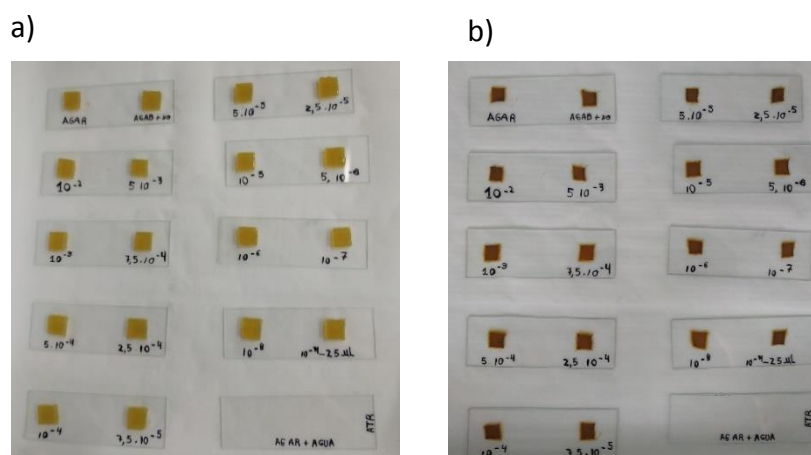


Figura 7.3.: Sustratos SERS basados en AgNPs inmovilizados en gel agar (*sustrato 1*) sembrado con diferentes concentraciones de tiram a) sin deshidratar y b) deshidratados.

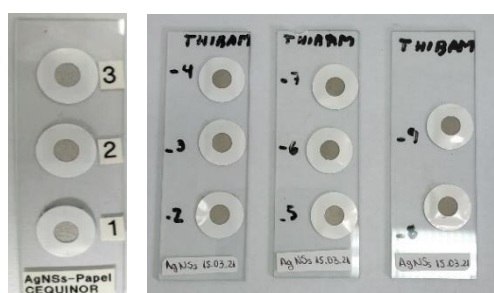


Figura 7.4.: Sustratos SERS basado en AgNSs soportado sobre papel de filtro de celulosa (*sustrato 2*) sembrados con diferentes soluciones de diferentes concentraciones tiram.

La preparación de muestras empleadas para la detección de tiram en cáscaras de frutas y vegetales empleando para cada uno de los sustratos se describirá más adelante en el capítulo en la **sección 7.3.5**.

7.4. Resultados y discusión

7.4.1. Espectroscopia UV-Vis y FTIR

En la **Figura 7.5**. se muestra el espectro UV-Vis obtenidos para una solución de tiram en etanol ($1,0 \times 10^{-5}$ M) medido en el rango de 240-900 nm con una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico. En el espectro electrónico se observa una banda de

alrededor de ~ 280 nm que corresponde al tiram. El estudio del analito por espectroscopia UV-Vis permitió determinar que no se espera que el tiram presente fenómenos de resonancia al ser estudiado mediante espectroscopia Raman y SERS con láseres visibles.

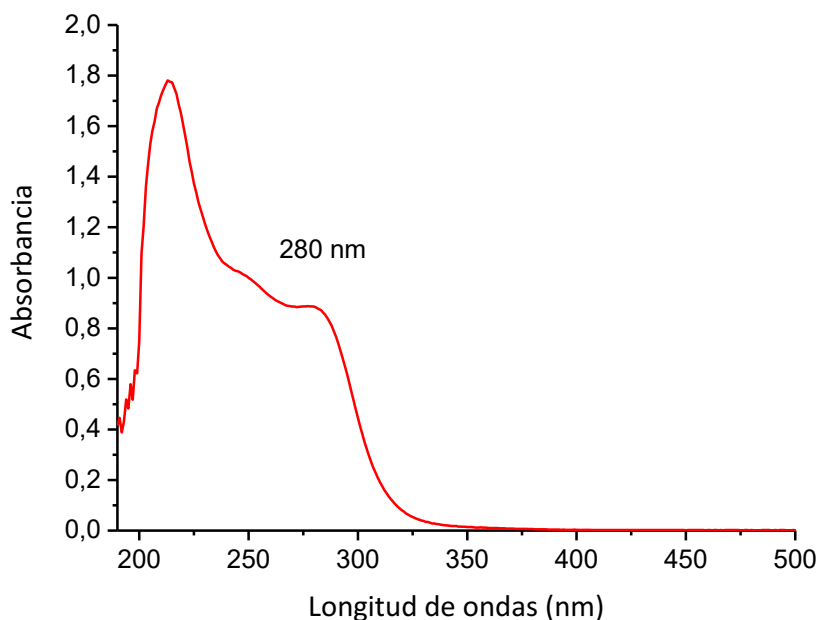


Figura 7.5.: Espectro UV-Vis de una solución de tiram en etanol ($1,0 \times 10^{-5}$ M) (*cut-off*_{etanol}: 210 nm).

La espectroscopia FTIR es una técnica complementaria de la espectroscopia Raman que permite corroborar la identidad estructural de una molécula. Por esta razón, se estudió el espectro FTIR del analito y se compararon con la literatura previamente reportada. En la **Figura 7.6.** se observa el espectro FTIR del tiram obtenido experimentalmente medido en la zona de $4000-400$ cm^{-1} además, en la **Figura 7.7.** se muestra la región de $600-180$ cm^{-1} .

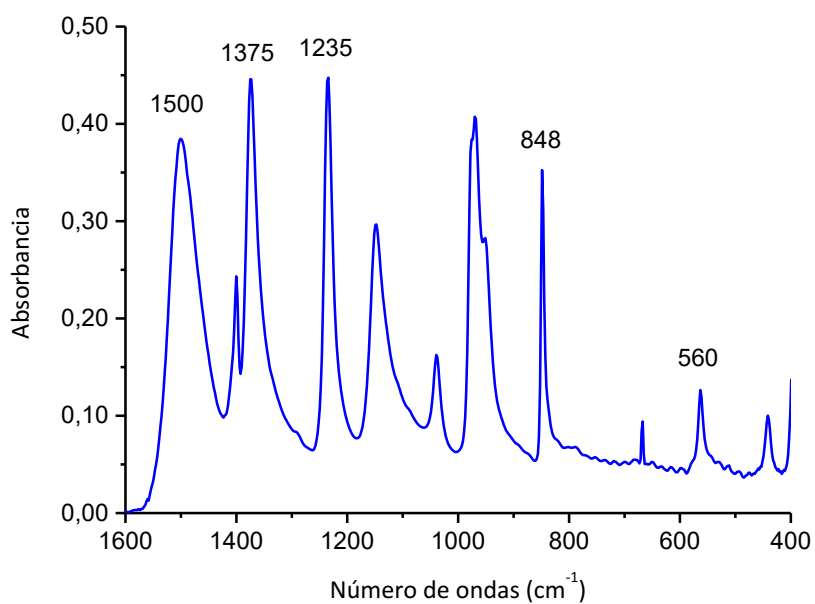


Figura 7.6.: Espectro FTIR de tiram en pastilla de KBr con tiram. Región de 1600-400 cm^{-1} . Acumulaciones: 64; Resolución: 4 cm^{-1} .

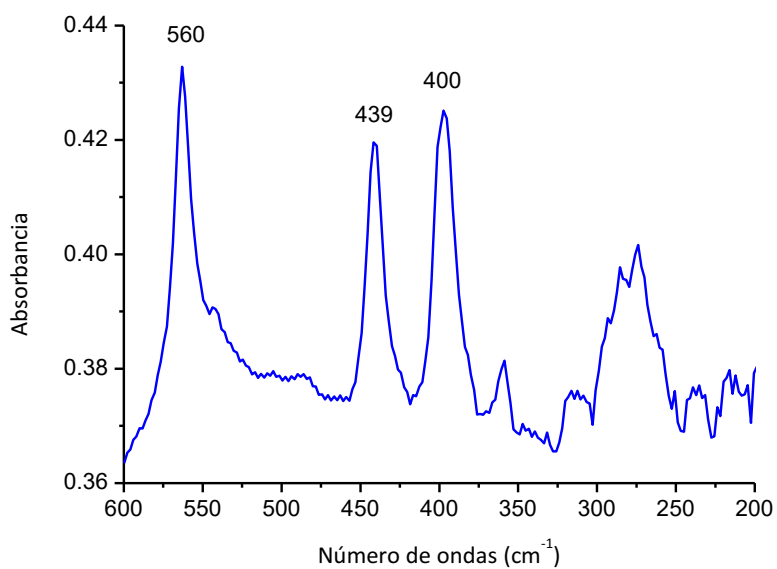


Figura 7.7.: Espectro FTIR de tiram en pastilla de polietileno con tiram. Región de 600-200 cm^{-1} . Número de acumulaciones: 128; Resolución: 4 cm^{-1} .

En el espectro FTIR de la **Figura 7.6.** se observan las bandas más intensas del tiram que se encuentran alrededor de 1500, 1375 y 1235 cm^{-1} , las cuales fueron

asignadas en base a los autores en la literatura [5,12]. Las bandas de ~ 1500 y 1375 cm^{-1} son asociadas principalmente a las deformaciones de los grupos ($-\text{CH}_3$). En la región de más baja frecuencia (**Figura 7.7.**) se observan 3 bandas predominantes a 560 , 440 y 400 cm^{-1} , en la que las dos primeras son asignadas a la deformación δ ($\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3$), mientras que la banda en ~ 400 cm^{-1} se asocia al estiramiento ν ($\text{S}-\text{S}$) [5]. El espectro IR de la molécula de tiram de la zona alta del espectro (desde 400 cm^{-1}) ha sido ampliamente descrito en la literatura. Sin embargo, son escasos los reportes de la zona baja del espectro IR (600 - 200 cm^{-1}).

Tabla 7.2.: Valores experimentales obtenidos de los espectros FTIR de tiram con sus asignaciones tentativas.

	Número de ondas (cm^{-1})	Asignación tentativa [5]
Tiram sólido	1500	ν NC
	1375	δ_s CH_3
	1235	ρ CH_3
	1146	ν_{as} ($\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3$)
	1039	ρ CH_3
	970	ρ CH_3
	848	ν_s ($\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3$)
	560	δ ($\text{CH}_3-\text{N}-\text{C}$)
	440	δ ($\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3$)
	400	ν ($\text{S}-\text{S}$)

ν = estiramiento, δ = deformación, ρ = balanceo, a = antisimétrico, s = simétrico

7.4.2. Espectroscopia SERS

Sustrato 1: Gel de agar-AgNPs

Si bien el sustrato flexible de AgNPs en gel de agar fue evaluado con la molécula de prueba MB (Capítulo 6), también se determinó la eficiencia del sustrato frente al tiram para posteriormente extender su estudio a la detección de este analito sobre cáscaras de frutas y vegetales. Para ello se tomaron espectros SERS de los gels contaminados intencionalmente con 10,0 μL de tiram de diferentes concentraciones tomando para cada uno de ellos entre 5-10 spots. En la **Figura 7.8.** se presentan los espectros representativos obtenidos al analizar el área de la banda a $\sim 1379\text{ cm}^{-1}$ para cada concentración de tiram evaluada. Además, se recolectaron mapas SERS; en la **Figura 7.9.a.** se muestra un mapa SERS de $25 \times 25\ \mu\text{m}$ de área del *sustrato 1* que contenía 24 ng/cm^2 del fungicida, el mismo contiene 625 espectros (25×25), lo que permitió determinar la uniformidad del sustrato.

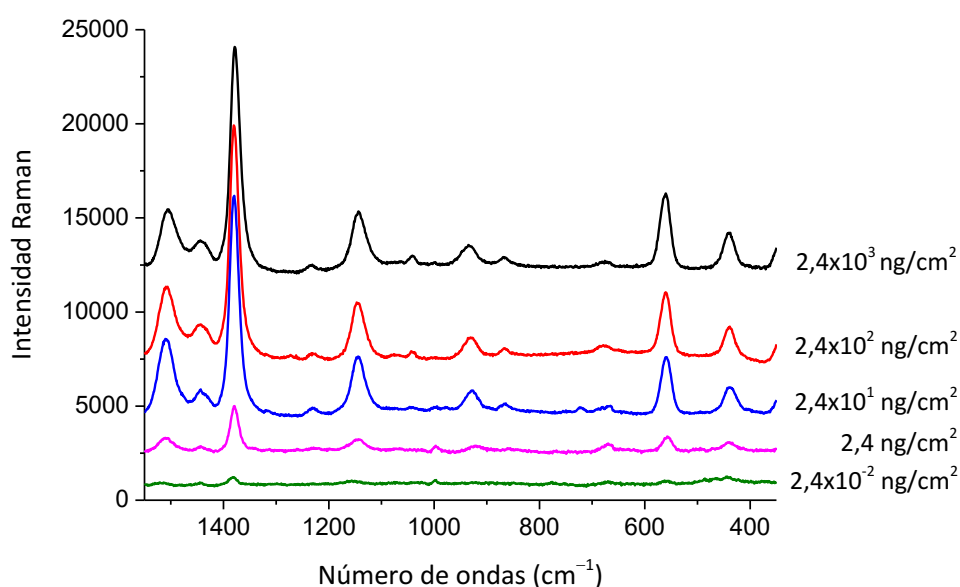


Figura 7.8.: Espectros SERS representativos de tiram obtenidos con el sustrato AgNPs en gel de agar (*sustrato 1*). Longitud de onda de excitación del láser: 647,1 nm; Potencia de salida del láser: 100 mW; 4 acumulaciones, tiempo de adquisición: 10 s; objetivo de 50x (0,75 NA).

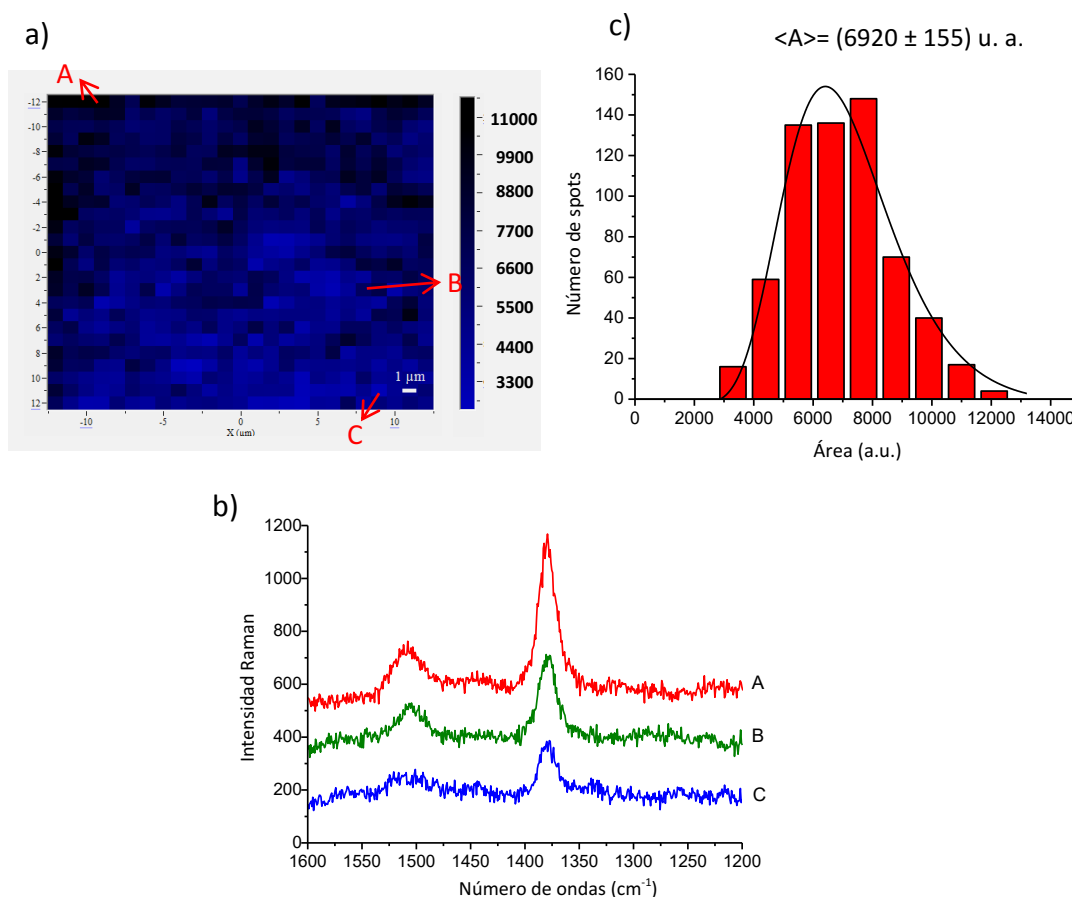


Figura 7.9: a) Mapa SERS de 25 x 25 μm de área del *sustrato 1* conteniendo 24 ng/ cm² de tiram (10,0 μL de solución de 1,0x10⁻⁵M). El área de cada espectro fue integrada entre 1405 y 1350 cm⁻¹ b) Espectros SERS seleccionados de 3 regiones de diferentes intensidades (A) intensidad alta (B) intensidad media y (C) intensidad baja. c) Representación del histograma de los 625 espectros tomados y ajustado con log-normal ($R^2=0,95$). Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 200 mW; tiempo de adquisición 1 s; 2 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA), espectros tomados cada 1 μm.

En la **Figura 7.9.b.** se muestran 3 espectros SERS seleccionados del mapa de diferentes regiones del sustrato. En el mismo se observan zonas de diferentes intensidades medidas como el área integrada bajo la curva de la banda de 1379 cm⁻¹ entre 1405 y 1350 cm⁻¹ señaladas en la imagen como A) de intensidad alta (~ 11x10³ a. u.), B) de intensidad media (~ 7x10³ a. u.) y C) de baja intensidad (~ 3x10³ a. u.). La representación del histograma **Figura 7.9.c** para los 625 puntos del mapa SERS fue ajustado con la función log-normal presentando un área promedio de 6920 ± 155 a.u.

El análisis del mapa permitió determinar la uniformidad relativa del tiram sobre el *sustrato 1*, determinando la fiabilidad del sustrato para el análisis de tiram con tan solo pocas medidas SERS (pocos spots).

Sustrato 2: Papel de filtro-AgNSs

Para evaluar el *sustrato 2*, en primer lugar se tomaron espectros Raman de los sustratos (papel sin analito) con la línea de excitación de 647,1 nm. El espectro sin analito o de fondo presentó una ventana espectral bastante limpia en la región de $\sim 1800-200 \text{ cm}^{-1}$ (**Figura 7. 10.**). En la zona de $\sim 220 \text{ cm}^{-1}$ se observa una banda que se encuentra presente en todos los espectros Raman tomados (con o sin analito), atribuida a la vibración Ag-O [6] y cuya intensidad se fue incrementando a medida que el sustrato se expuso a la radiación láser y/o al aire.

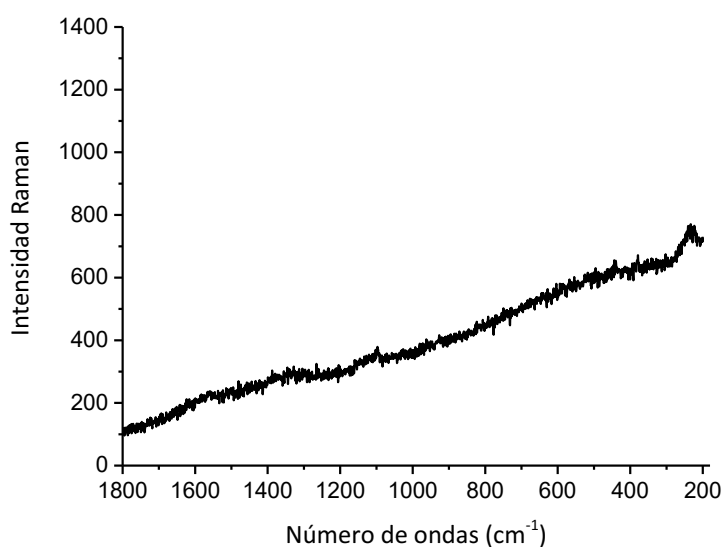


Figura 7.10.: Espectro Raman (blanco) sin corregir del *sustrato 2*. Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; Potencia de salida del láser: 100 mW; Tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; Objetivo de 50x (0,75 NA).

Posteriormente, se determinó la eficiencia del *sustrato 2* frente al plaguicida. Para ello se sembraron sustratos con 10,0 μL de soluciones de tiram de diferentes concentraciones ($1,0 \times 10^{-2}$; $5,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $5,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $1,0 \times 10^{-6}$ M) preparadas en el día. Luego de su secado ($\sim 1 \text{ h}$) se colectaron de

5 a 10 spots para cada uno de los sustratos contaminados intencionalmente con cada una de las soluciones del fungicida. En la **Figura 7.11.** se observan los espectros SERS seleccionados como representativos teniendo en cuenta el área integrada bajo la curva de la banda de 1379 cm^{-1} comprendida entre 1405 cm^{-1} y 1350 cm^{-1} . No fue posible observar ninguna señal SERS para la solución más diluida. A partir de la señal a 1379 cm^{-1} , se construyó una curva de calibración donde el área de la banda 1379 cm^{-1} fue promediada para 5-10 puntos diferentes para cada una de las concentraciones y se representó frente a la concentración superficial previamente sembrada sobre cada uno de los sustratos (**Figura 7.12.**).

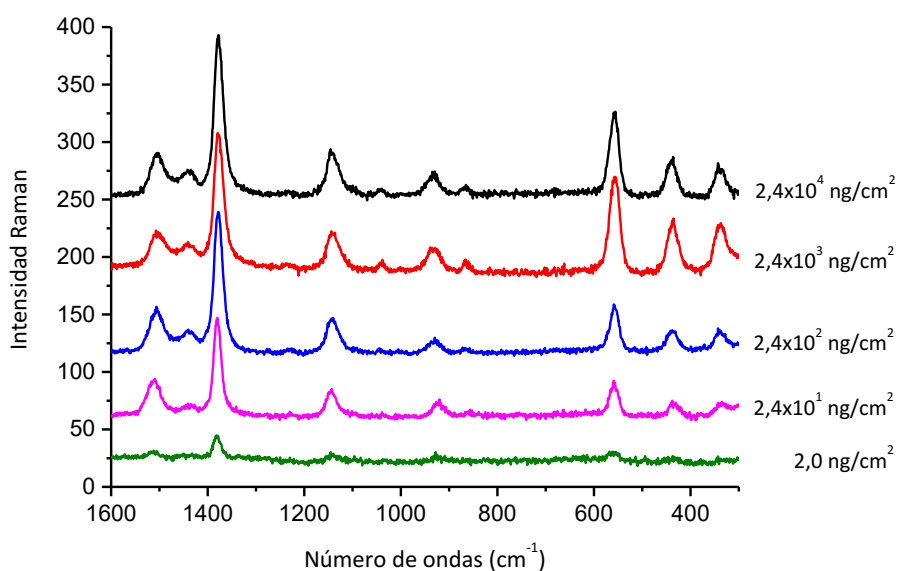


Figura 7.11.: Espectros SERS de tiram representativos obtenidos con el sustrato AgNSs en papel de celulosa. Longitud de onda de excitación del láser: $647,1\text{ nm}$; Potencia de salida del láser: 100 mW ; 4 acumulaciones, tiempo de adquisición: 10 s ; objetivo de $50\times$ ($0,75\text{ NA}$).

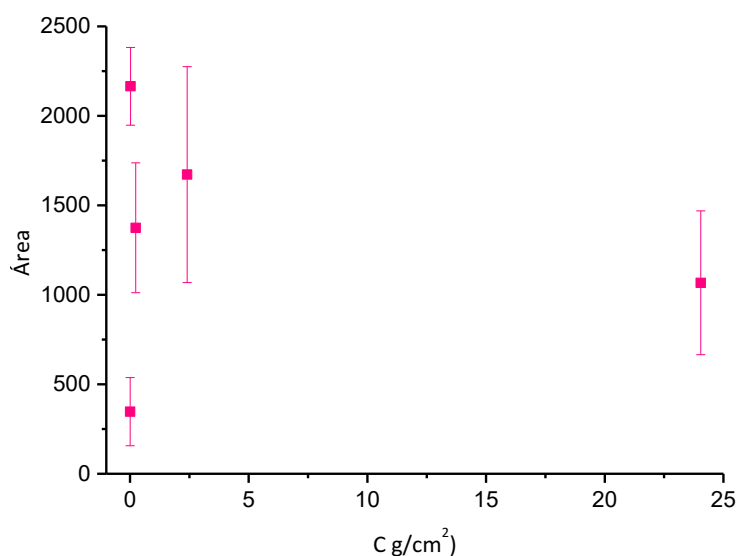


Figura 7.12.: Dependencia de la intensidad SERS de tiram medida en 1379 cm^{-1} con la concentración de sembrada en el *sustrato 2*. Los puntos corresponden al promedio de los diferentes spots tomados y las barras de error indican la desviación estándar.

Como se comentó en el capítulo 6, dado que la intensidad SERS es proporcional al número de moléculas adsorbidas en el sustrato, el gráfico presentado en la **Figura 7.12.** puede considerarse como una isoterma de adsorción. Adicionalmente, en la figura se puede observar la variabilidad de las medidas como la desviación estándar (SD) de los spots tomados aleatoriamente (5-10 spots) mediante la barra de error para cada concentración de tiram mostrando mayor dispersión en el *sustrato 2* en relación con el primer sustrato.

7.4.3. Características espectrales del tiram

Si se observa la estructura de la molécula de tiram (**Figura 7.1.**) se puede considerar que consiste en dos unidades planas de dimetilditiocarbamato (DMDTC), $(\text{CH}_3)_2\text{NC}(\text{S})\text{S}-$, unidas a través de un enlace disulfuro [7]. En las **Figuras 7.13.** y **7.14.** se muestran el espectro Raman de tiram sólido utilizado para realizar todos los ensayos de este analito, medido en un capilar de vidrio sellado a la llama, y además se muestra junto con el espectro SERS del plaguicida sobre el sustrato de gel agar con las AgNPs conteniendo $2,4 \times 10^2\text{ ng/cm}^2$ de tiram.

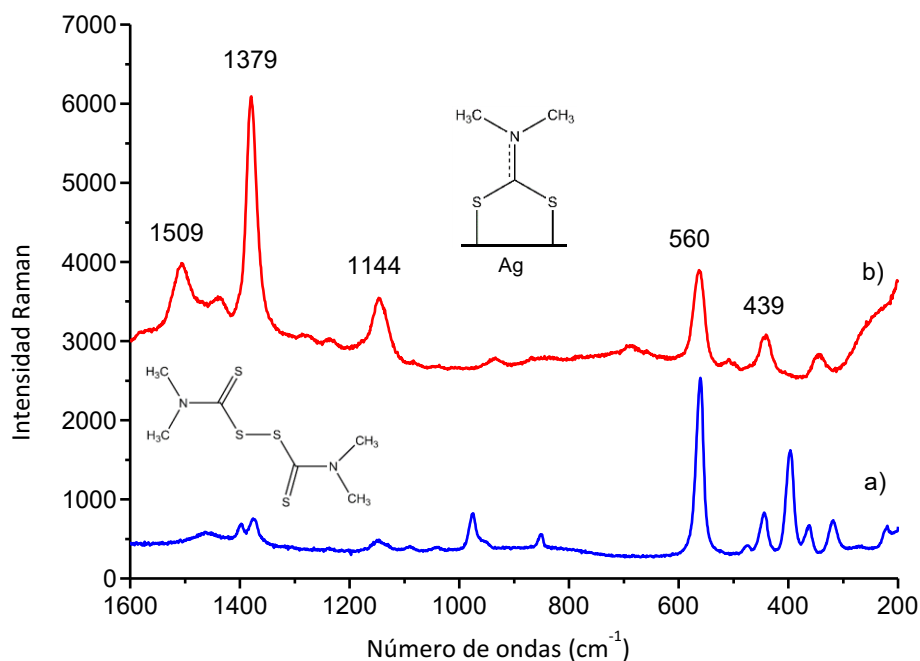


Figura 7.13.: a) Espectro Raman (región $1600\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) de muestra de polvo de tiram (Longitud de onda de excitación: $647,1\text{ nm}$; potencia de salida del láser: 100 mW ; tiempo de adquisición: 20 s ; 16 acumulaciones; objetivo $10\times$ ($0,25\text{ NA}$)). b) Espectro SERS (región $1600\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) de tiram sobre el sustrato de gel AgNPs que contiene $2,4\times 10^2\text{ ng/cm}^2$ de tiram ($10,0\text{ }\mu\text{L}$ de solución $1,0\times 10^{-4}\text{ M}$) (Longitud de onda de excitación: $647,1\text{ nm}$; potencia de salida del láser: 100 mW ; tiempo de adquisición: 10 s ; 8 acumulaciones; objetivo $50\times$ ($0,75\text{ NA}$)).

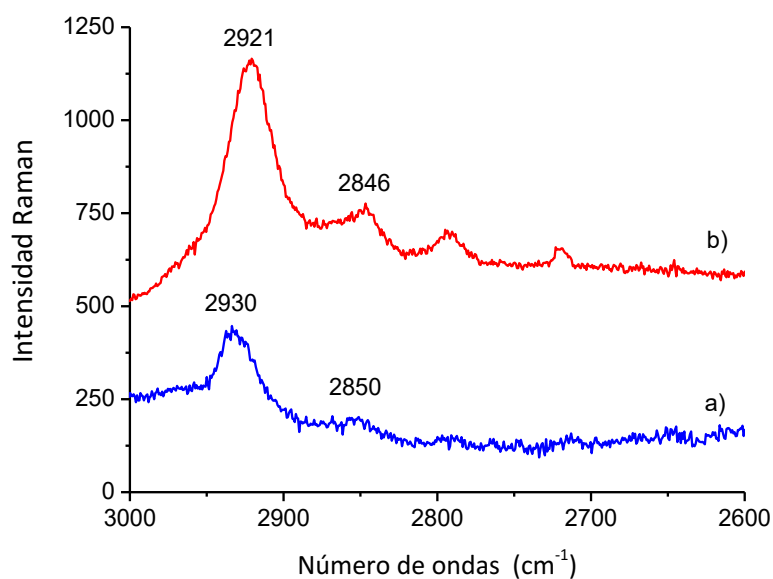


Figura 7.14.: a) Espectro Raman (región 3000-2600 cm^{-1}) de tiram con longitud de onda de excitación de 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 20 s; 16 acumulaciones; objetivo de 10x (0,25 NA), b) Espectro SERS (región 3000-2600 cm^{-1}) de tiram sobre sustrato SERS (1) conteniendo $2,4 \times 10^2 \text{ ng/cm}^2$ de tiram (10,0 μL de solución $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$) (Longitud de onda de excitación 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 8 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Como se puede observar en la **Figura 7.13.**, el espectro SERS de la molécula de tiram presenta cambios significativos en comparación con el espectro Raman normal de la muestra sólida. Dichos cambios pueden comprenderse considerando que el adsorbato presenta en su estructura átomos de S que exhiben gran afinidad por las superficies metálica de Ag. Por esta razón, los grupos tioles normalmente se utilizan para funcionalizar las superficies metálicas [8]. Como fue mencionado anteriormente y se informa en la literatura [7], el tiram, al igual que otros compuestos que presentan enlaces disulfuros, al interactuar con la superficie metálica como en este caso sobre la Ag, se quimisorbe, fragmentándose a través del enlace S–S, resultando en la formación de dos unidades de DMDTC como se observa en la **Figura 7.15.**

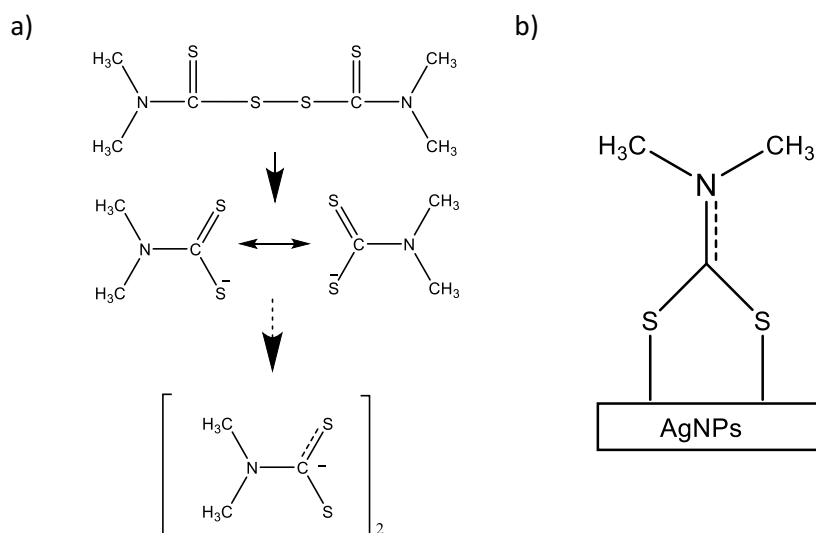


Figura 7.15.: a) Estructura del tiram y escisión del enlace disulfuro b) Absorción de tiram a la superficie metálica de plata.

En la **Figura 7.13.** se muestra una representación esquemática del fragmento de DMDTC adsorbido como la forma de tioureido, que se ve favorecida cuando el fragmento se quimisorbe en la superficie metálica. Esto podría ser explicado debido a que el par de electrones libres del átomo de N induce una transferencia de carga desde el átomo de N al metal que conduce a la formación de un compuesto tioureido [8,9]. La escisión del enlace S–S del tiram en la superficie del metal también puede sugerirse por la similitud del espectro SERS del tiram cuando se compara con los espectros Raman normales informados de las sales DMDTC, como ziram (Zn (DMDTC)₂) [9], NaDMDTC [10], Ni(DMDTC)₂ [11] y los espectros SERS reportados para sales de DMDTC [10,12].

Las asignaciones vibracionales de los espectros Raman y SERS de la molécula de tiram han sido reportadas por varios autores, muchas veces con discrepancias sobre algunas de sus bandas [5,13,14]. Las primeras asignaciones de las bandas vibracionales de SERS del plaguicida adsorbido sobre plata en la región por debajo de 1600 cm⁻¹ empleando la longitud de onda de excitación de 647,1 nm fue reportada en 1992 por Narayanan y col. [13]. Por otro lado, en un estudio publicado recientemente [14] se realizó la asignación de las bandas vibracionales para los espectros Raman y SERS del fungicida comparando los espectros experimentales con los calculados por los métodos de la Teoría Funcional de la Densidad (DFT) para el tiram aislado y la unidad

de DMDTC unida a un solo átomo de plata o a un grupo de átomos Ag. Además, se hicieron análisis de coordenadas normales de los modos de vibración de tiram que han sido informados previamente por Coleman y col. [5]. Del mismo modo, se han reportado el análisis de coordenadas normal para el complejo de Ni (DMDTC)₂ [11].

En la **Tabla 7.3.** se muestran las principales bandas Raman observadas en el espectro de la muestra sólida y el espectro SERS de tiram registrado en este trabajo, junto con los valores informados previamente por otros autores. Un punto importante para tener en cuenta es que si asumimos la escisión del enlace S–S de la molécula de tiram, el espectro SERS del analito adsorbido corresponde a una especie diferente, por lo que es necesario redefinir la asignación vibracional.

Tabla 7.3.: Número de ondas (cm⁻¹) de las bandas observadas en el espectro Raman normal (muestra sólida) y en el espectro SERS del tiram.

	Número de ondas (cm ⁻¹)		Asignaciones ^b
	Muestra sólida	Reportadas previamente	
Tiram sólido	2930 (m)	2933 ^c	ν_{as} CH ₃
	2850 (vw)	2849 ^c	ν_s CH ₃
	1460 (w, br)	1463 ^c , 1460 ^d	δ_a CH ₃
	1398 (m)	1397 ^c , 1396 ^d	δ_s CH ₃
	1375 (m)	1372 ^c , 1371 ^d	δ_s CH ₃
	1146 (w)	1149 ^c , 1146 ^d	ν_{as} (CH ₃ –N–CH ₃)
	1088 (vw)	1088 ^c , 1085 ^d	ρ CH ₃
	1039 (vw)	1040 ^c , 1042 ^d	ρ CH ₃
	976 (s)	975 ^c , 973 ^d	ρ CH ₃
	954 (m, sh)	954 ^c (sh), 952 ^d	ν (C=S)
	851 (m)	849 ^d , 850 ^c	ν_s (CH ₃ –N–CH ₃)
	560 (vs)	558 ^{c, d}	δ (CH ₃ –N–C)
	444 (m)	441 ^{c, d}	δ (CH ₃ –N–CH ₃)
	396 (s)	393 ^c , 392 ^d	ν (S–S)
	362 (m)	360 ^{c, d}	δ (CH ₃ –N–C)
318 (m)	316 ^{c, d}	δ (S=C–S)	

Tiram sobre el sustrato SERS	2921 (m)	2937 ^e	ν_a (CH ₃)
	2846 (w)	2852 ^e	ν (CH ₂)
	2793 (w)		ν_s (CH ₃)
	1509 (m)	1514 ^e , 1510 ^f	ν (C–N)
	1442 (m)	1448 ^e , 1444 ^f	δ_a CH ₃
	1379 (vs)	1386 ^e , 1376 ^f	δ_s CH ₃
	1279 (w)		ν_{as} (CH ₃ –N–CH ₃)
	1235 (w)		ρ CH ₃
	1144 (m)	1145 ^e , 1136 ^f	ρ CH ₃
	930 (w)	933 ^e , 930 ^f	ν_{as} (S–C–S)
	560 (s)	563 ^e , 558 ^f	ν_s (S–C–S)
	439 (m)	441 ^e , 438 ^f	δ (CH ₃ –N–CH ₃)
	340 (m)	341 ^e , 338 ^f	ν (AgS)

^a vs = muy fuerte, s = fuerte, m = medio, w = débil, vw = muy débil, ν = estiramiento, δ = deformación, ρ = balanceo, a = antisimétrico, s = simétrico, sh = hombro, br = ancho.

^b La asignación tentativa se realizó basándose principalmente en la predicción del cálculo de B3LYP/6-31+G* para tiram aislado y una unidad de dimetilditiocarbamato (DMDTC) unida a un átomo de plata. ^c [13]; Espectro Raman del sólido, $\lambda_{excitación} = 514,5$ nm ^d [5]; Espectro Raman del sólido, $\lambda_{excitación} = 514,5$ nm. ^e [9]; FT-SERS Espectro de solución de thiram 10^{-5} M en etanol-coloides de plata, $\lambda_{excitación} = 1064,0$ nm. ^f [7]; Espectro SERS de 1000 ng/ μ L de solución de etanol con sustrato de plata, $\lambda_{excitación} = 647,1$ nm.

La banda más intensa presente en los espectros SERS se encuentra en ~ 1379 cm^{-1} y puede asignarse al modo de deformación simétrica CH₃. Esta banda se utilizó en esta Tesis para calibrar la intensidad SERS en función de la concentración de tiram. La intensificación de este modo vibracional en el espectro SERS podría deberse a la orientación perpendicular del analito con respecto al metal [9]. La banda presente en ~ 1509 cm^{-1} en los espectros SERS se puede asignar a ν (C–N), lo que indica por su posición la fuerza de la interacción entre el fragmento DMDTC y la superficie. El carácter de doble enlace presente en el C–N sugiere que se absorbe la forma de tioureido de la unidad DMDTC.

7.4.5. Detección de residuos de tiram en cáscaras de frutas y vegetales

Sustrato 1: Gel agar-AgNPs

Para la detección *in situ* de residuos de tiram en las superficies de las cáscaras de frutas y verduras (manzana, frutilla, morrón verde, berenjena, cereza y tomate), se cortaron las cáscaras de 1 cm² previamente lavadas con agua de la canilla y enjuagadas con agua destilada y se contaminaron intencionalmente las superficies con 25,0 µL de las soluciones de tiram en acetona de diferentes concentraciones alcanzándose concentraciones de 6,0x10⁻³ a 6,0x10⁻⁴ ng/cm². Posteriormente, luego de evaporado el solvente, se realizó el proceso de microextracción sobre cada una de las cáscaras sembradas. El proceso de microextracción se basa en dos pasos; el primero de ellos consiste en colocar 25,0 µL de acetona sobre las superficies de las frutas y vegetales sembradas anteriormente para disolver el plaguicida absorbido o que ha penetrado en el interior de las cáscaras, seguido de un segundo paso donde se frota la superficie de la piel de las frutas y vegetales con el sustrato de gel de agar de 1 cm² durante aproximadamente 15 s. En la **Figura 7.16.** se puede ver el esquema general del proceso. De manera conjunta se prepararon los blancos de cada una de las frutas estudiadas, para lo que se colocó sobre las superficies de las frutas y vegetales recortadas 25,0 µL de acetona, se esperó a que se evapore y se volvió a sembrar con 25,0 µL como en el proceso de microextracción y luego se frotaron las cáscaras empleando el gel de agar con la AgNPs. En ambos casos, tanto los geles con muestras como los blancos se dejaron secar colocados en portaobjetos de microscopio y al abrigo de la luz durante aproximadamente 24 h hasta su total deshidratación para poder llevar a cabo las medidas SERS.



Figura 7.16.: Representación esquemática del proceso general de detección de plaguicidas sobre cáscaras de frutas y vegetales empleando la plataforma SERS de AgNPs inmovilizada en gel de agar.

Los espectros Raman de los experimentos de control o blancos de las cáscaras de frutas y vegetales no mostraron señales significativas, lo que demuestra que las posibles moléculas presentes en las superficies de las cáscaras lavadas no interferirán en la detección de tiram. En la **Figura 7.17.** se pueden observar los espectros Raman de los blancos de las diferentes frutas y verduras estudiadas. Si bien los blancos de las cáscaras parecen tener señales, las mismas corresponden al blanco del sustrato de gel agar (sin analito) mostrado anteriormente en la **Figura 6.6.** del capítulo precedente.

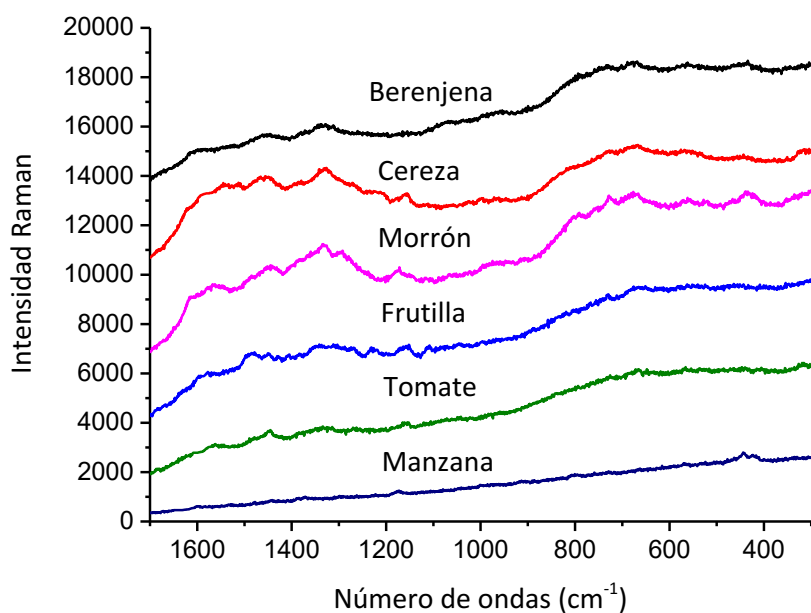


Figure 7.17.: Espectros Raman de los blancos de frutas y vegetales estudiados empleando el sustrato desarrollado de 1 cm² de AgNPs en gel de agar. Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; acumulaciones: 4; tiempo de adquisición: 10s; objetivo 50x (0,75 NA). Las líneas de base de los espectros no fueron corregidas.

La **Figura 7.18.a** muestra espectros SERS representativos de los sustratos de gel de agar con AgNPs deshidratados empleados para extraer el fungicida de cáscaras de vegetales y frutas (morrón verde, tomate y manzana) contaminadas con diferentes concentraciones de tiram. La intensidad de las bandas SERS del tiram decayeron significativamente a medida que disminuyó la concentración superficial del fungicida. En algunos casos se decidió obtener un espectro en una región acotada de números de ondas, para evitar el daño por radiación de las muestras, especialmente para las de menor concentración de tiram. La **Figura 7.18.b** muestra adicionalmente la relación lineal entre el pico característico principal de tiram adsorbido ($\sim 1379 \text{ cm}^{-1}$) y la concentración superficial. Dentro de cada gráfico se muestran los parámetros obtenidos para la regresión lineal junto con el coeficiente de correlación al cuadrado (R^2).

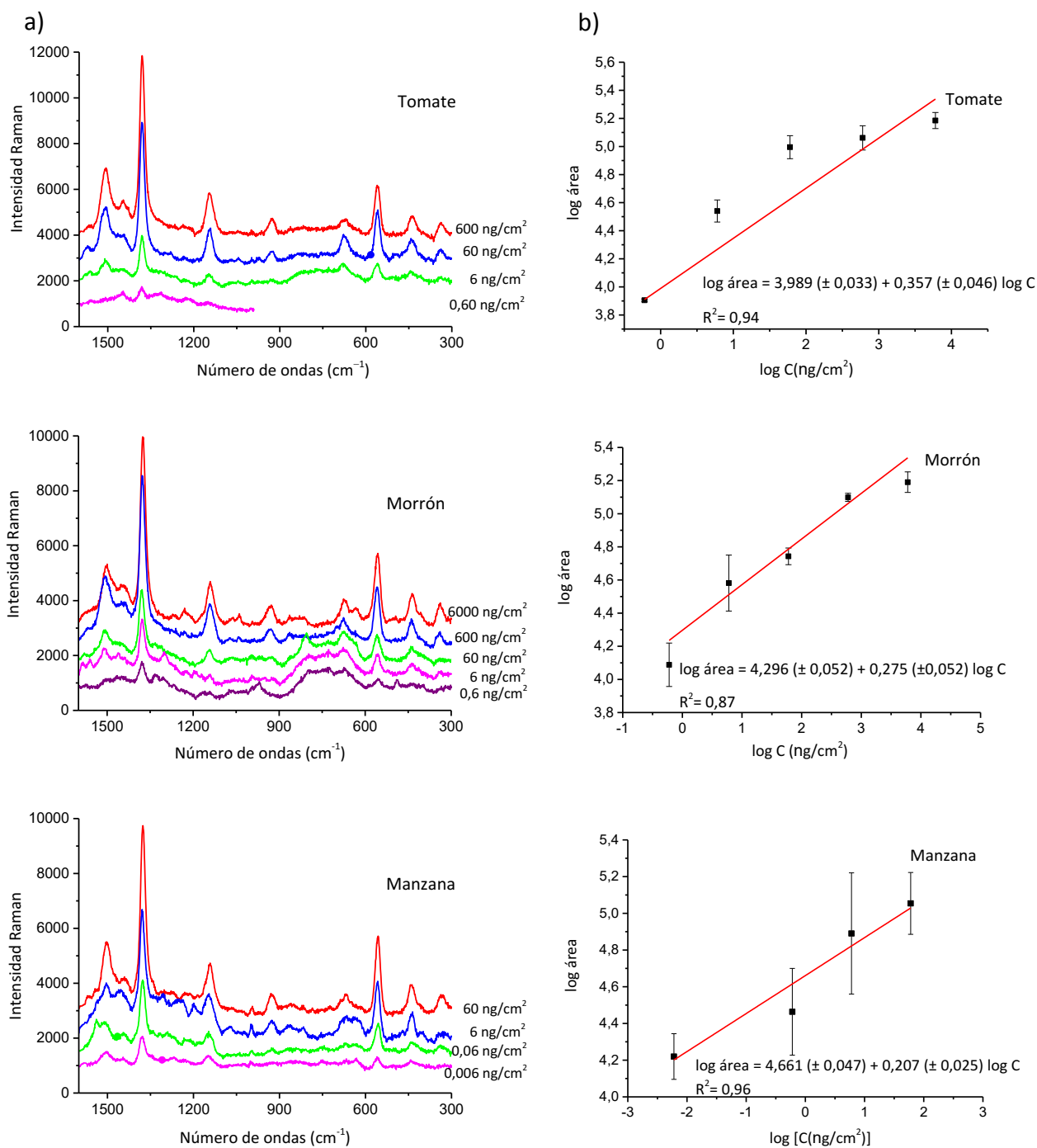


Figura 7.18.: a) Espectros SERS seleccionados de tiram sobre los sustratos de gel de agar con AgNPs frotados sobre las diferentes cáscaras de frutas y verduras contaminadas con tiram. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)) b) intensidad SERS de tiram medida a 1379 cm^{-1} (área integrada entre 1405 y 1350 cm^{-1}) en función de la concentración superficial de tiram (en ng/cm^2) en las cáscaras de frutas y verduras. Los cuadrados corresponden al promedio de mediciones en diferentes puntos y las barras de error indican desviación estándar.

En la **Figura 7.19.** se pueden observar las intensidades SERS de las mediciones individuales para cada concentración superficial medidas a 1379 cm^{-1} (área integrada entre 1405 y 1350 cm^{-1}) para distintos spots seleccionados aleatoriamente en los sustratos de gel de AgNPs frotados sobre cáscaras de tomate, morrón y manzana contaminadas con diferentes cantidades de tiram.

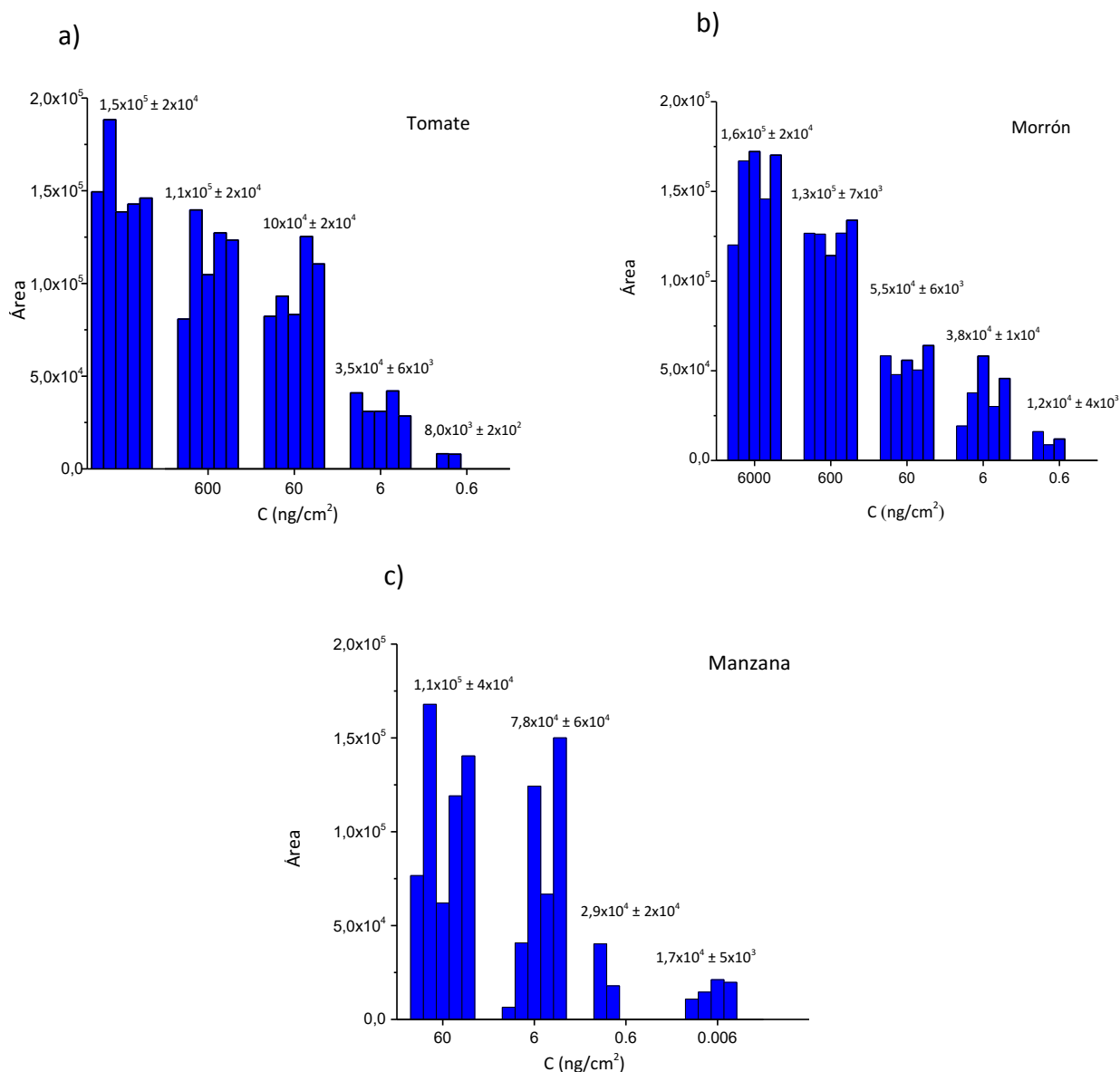


Figura 7.19.: Intensidad SERS medida a 1379 cm^{-1} (área integrada entre 1405 y 1350 cm^{-1}) recolectados de puntos de detección aleatorios en los sustratos de gel de AgNPs frotados sobre cáscaras de frutas y verduras contaminadas con diferentes cantidades de tiram a) cáscara de tomate; b) cáscara de morrón; c) cáscara de manzana.

Para obtener información sobre la reproducibilidad de los resultados obtenidos, se repitieron las mediciones seleccionadas. Para ello, se tomaron espectros SERS para diferentes trozos o pedazos de una determinada fruta o verdura contaminada con la misma concentración superficial de tiram. En la **Figura 7.20.** se observan dos espectros SERS representativos de diferentes cáscaras de manzanas contaminado con la misma concentración superficial. Los espectros SERS obtenidos muestran una variación de intensidad similar a la obtenida en diferentes puntos del sustrato de la misma muestra.

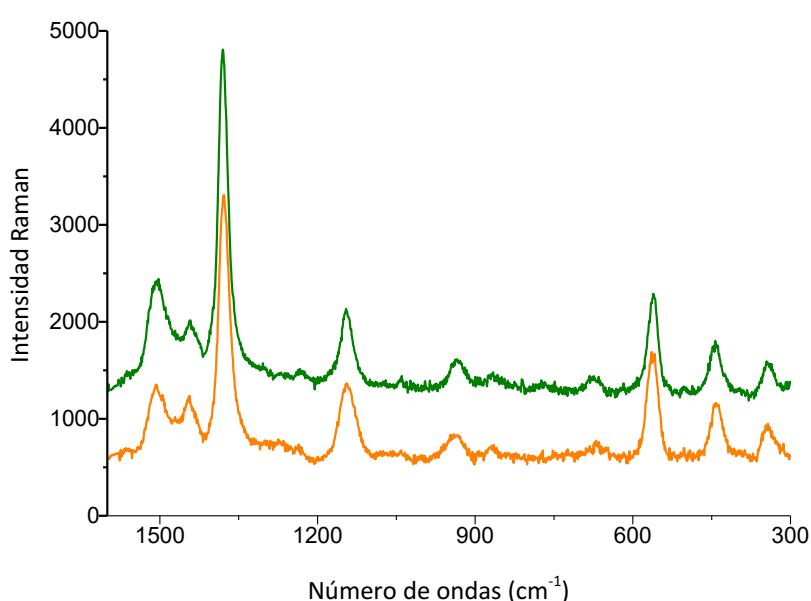


Figure 7.20.: Espectros SERS seleccionados de sustratos de gel de AgNPs deshidratados que contienen tiram extraído de diferentes cáscaras de manzana ($6,0 \times 10^2 \text{ ng/cm}^2$). (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Para determinar si el sustrato desarrollado es eficiente como herramienta analítica, se ha calculado el límite de detección. Según la IUPAC (del inglés, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) se define como “Límite de detección (LD) como un número expresado en unidades de concentración (o cantidad) que describe el más bajo nivel de concentración (o cantidad) de una sustancia que puede determinarse como estadísticamente diferente del blanco analítico”. El límite de detección (LD) de tiram se calculó utilizando la ecuación (7.1.) [15,16,17].

$$LD = \frac{3 S_w}{b} \quad (7.1.)$$

donde S_w corresponde a la desviación estándar de la intensidad SERS medida como el área integrada entre 1350-1405 cm^{-1} para controles en blanco (~ 220 u.a.) y “b” la pendiente de las curvas de calibración (intensidad SERS vs concentración de tiram). El límite de detección (LD) para tiram en cáscara de manzana calculado usando la ecuación 7.1. fue de 2,0 pg/cm^2 mientras que el LD obtenido para cáscaras de tomate y morrón verde fue de $1,4 \times 10^2 \text{ pg}/\text{cm}^2$.

Por otro lado, se determinó la capacidad del *sustrato 1* de conservar la señal a lo largo del tiempo. Con este fin, el gel de agar con AgNP deshidratado y conteniendo tiram extraído de una cáscara de manzana contaminada con $2,4 \times 10^3 \text{ ng}/\text{cm}^2$ se conservó a temperatura ambiente y se midió periódicamente para evaluar su capacidad para conservar el analito. Las señales del plaguicida se observaron prácticamente con la misma intensidad durante al menos 10 meses después de su preparación (**Figura 7.21.**).

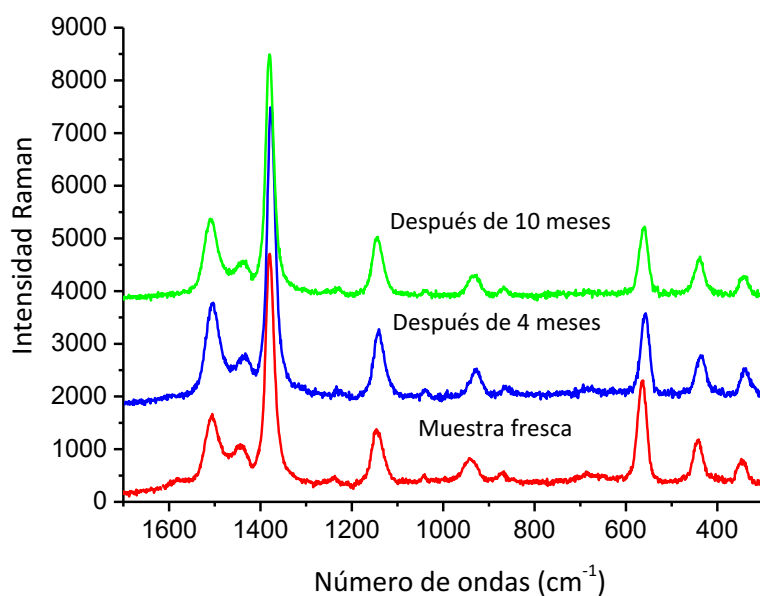


Figura 7.21.: Espectros SERS seleccionados de un sustrato de gel de agar con AgNPs deshidratado que contiene tiram extraído de una cáscara de manzana ($2,4 \times 10^3 \text{ ng}/\text{cm}^2$): recién preparado (línea roja), después de 4 meses (línea azul) y después de 10 meses (línea verde) (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Un buen sustrato SERS debe tener la capacidad de ser utilizado en diferentes sistemas complejos. Con el fin de verificar la aplicación práctica del sustrato de gel AgNPs, se contaminaron con tiram otras cáscaras de frutas y verduras (cereza, frutilla y berenjena). La **Figura 7.22.** muestra los espectros obtenidos para la menor concentración superficial detectada de tiram en las frutas y verduras mencionadas: $6,0 \times 10^2$, 60 y 12 pg/cm^2 para las cáscaras de berenjena, cereza y frutilla, respectivamente. Las variaciones en la sensibilidad pueden atribuirse a las diferencias en las propiedades superficiales de las cáscaras de frutas y verduras y la fuerza de interacción entre el tiram con cada una de ellas.

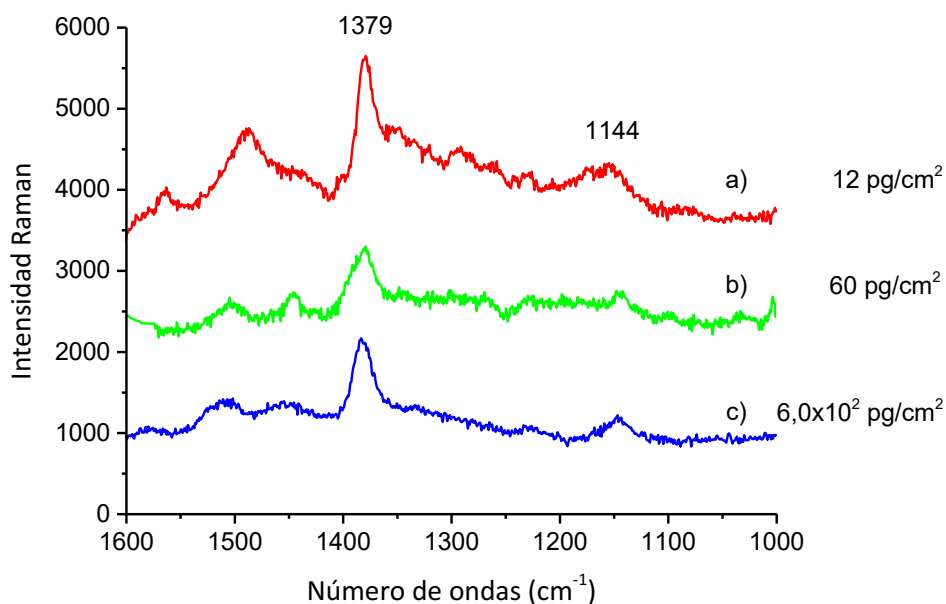


Figura 7.22.: Espectros SERS de tiram (LD) en: a) cáscaras de frutilla, b) cereza y c) berenjena. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Sustrato 2: Papel de filtro-AgNSs

Para la detección de residuos del fungicida tiram en las cáscaras frutas y verduras seleccionadas, se procedió de la misma manera que con el sustrato antes mencionado, es decir, se cortaron cáscaras de 1 cm^2 previamente lavadas con agua de la canilla y enjuagadas con agua destilada y se contaminaron intencionalmente las superficies con $10,0\ \mu\text{L}$ de soluciones de tiram en acetona de diferentes concentraciones. Luego de la evaporación del solvente de la superficie se llevó a cabo el proceso de microextracción. Para ello se colocó sobre las superficies de los frutos $10,0\ \mu\text{L}$ del solvente y se frotó la superficie de las cáscaras con el *sustrato 2* de 1 cm^2 durante 15 s. Posteriormente, los sustratos se colocaron en portaobjetos de microscopio y se les colocó papel ojalillo plástico para sujetarlos al vidrio. Se dejaron secar los sustratos durante $\sim 1\text{ h}$ antes de realizar las medidas SERS. Además, se prepararon sustratos sin analito como control o blanco de las cáscaras de frutas y vegetales estudiadas; para lo que se colocó sobre las superficies de las frutas y vegetales recortadas $10,0\ \mu\text{L}$ de acetona, se esperó a que se evapore el solvente y se volvió a adicionar $10,0\ \mu\text{L}$ como en el proceso de microextracción, luego se frotaron las cáscaras empleando el *sustrato 2*. Los sustratos se colocaron en portaobjetos de microscopio y se les colocó papel ojalillo para sujetarlos al vidrio. Finalmente, se dejaron secar los sustratos durante $\sim 1\text{ h}$ antes de las medidas SERS. En la **Figura 7.23**, se muestra esquemáticamente el proceso general de detección de residuos de tiram sobre cáscaras de frutas y vegetales.

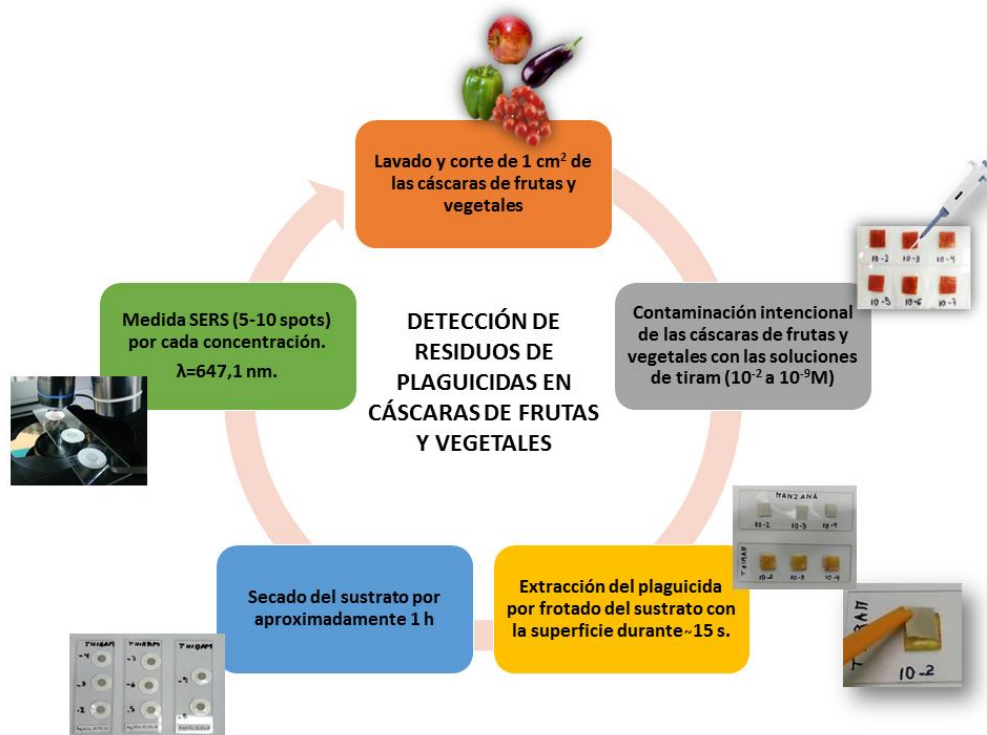


Figura 7.23.: Representación esquemática del proceso general de detección de tiram sobre cáscaras de frutas y vegetales empleando el sustrato SERS flexible basado en AgNSs impregnada en papel de filtro de celulosa.

Los espectros Raman de los de controles de las cáscaras de manzana y morrón no mostraron señales que pudieran interferir en el proceso de detección del plaguicida, asegurando de esta manera que las señales que se observen en los espectros SERS corresponderán al analito en estudio. En la **Figura 7.24.** se pueden ver los espectros Raman de los blancos sin corrección de las cáscaras de manzana y morrón verde.

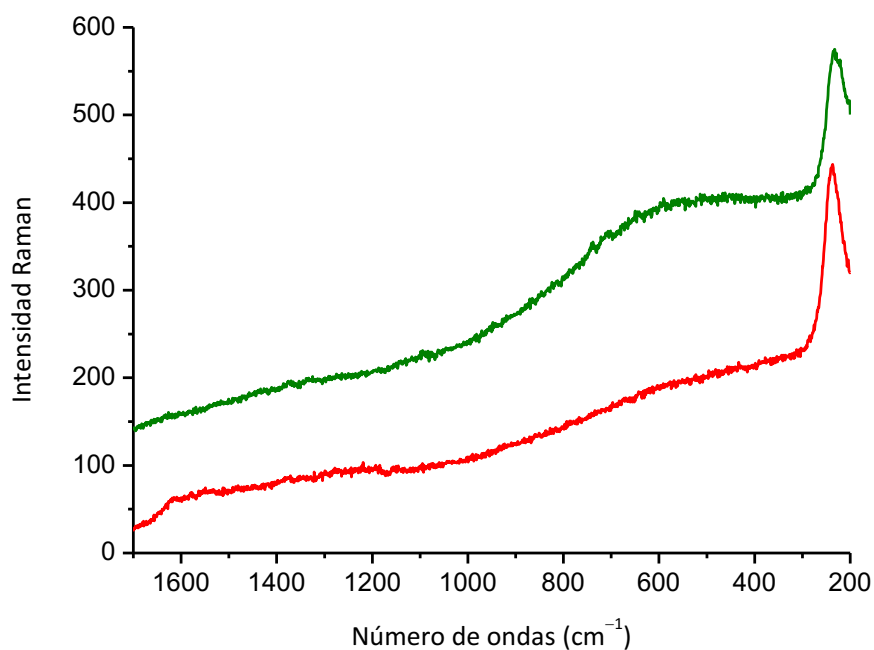


Figura 7.24.: Espectros Raman de los blancos de manzana (línea roja) y morrón verde (línea verde) empleando el *sustrato 2* de 1 cm² de AgNSs sobre papel de filtro. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; acumulaciones: 4; tiempo de adquisición: 10 s; objetivo 50x (0,75 NA)). Los espectros Raman no fueron corregidos.

Las **Figura 7.25.** y **7.26.** se muestran los espectros SERS representativos de tiram empleando los sustratos de AgNSs sobre papel de filtro para extraer el fungicida de cáscaras de manzana y morrón verde, contaminadas con soluciones de diferentes concentraciones de soluciones de tiram.

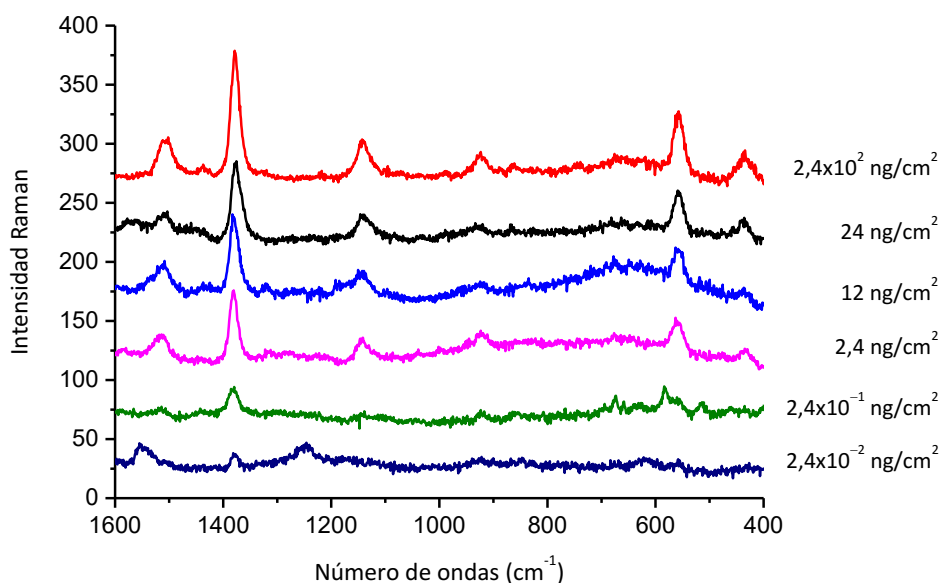


Figura 7.25.: Espectros SERS seleccionados de sustratos de AgNSs sobre papel de filtro frotados sobre las cáscaras de manzana contaminadas con tiram (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

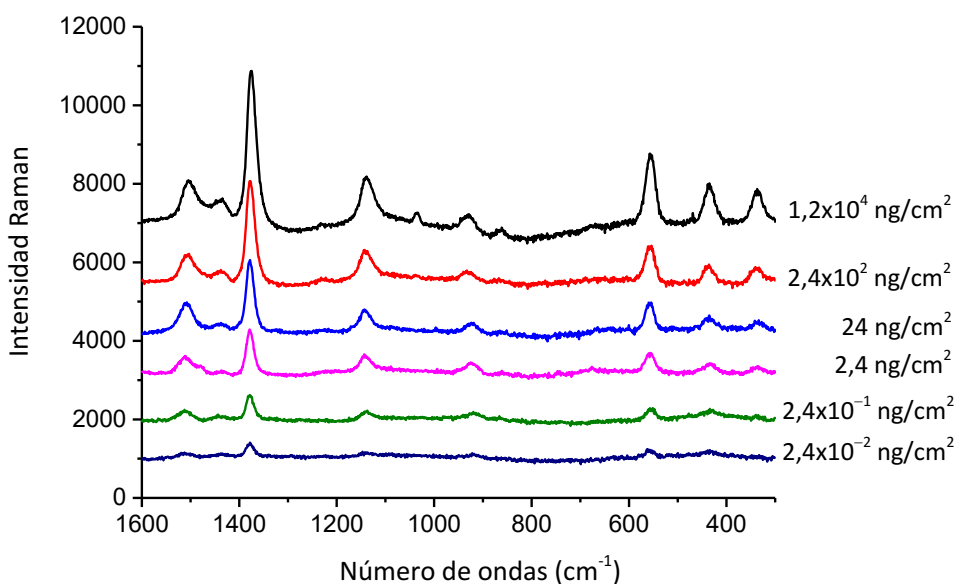


Figura 7.26.: Espectros SERS seleccionados de sustratos de AgNSs sobre papel de filtro frotados sobre las cáscaras de morrón contaminadas con tiram (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

7.5. Conclusiones

En la **Tabla 7.4.** se puede observar una comparación de los LD reportados para la detección de tiram en distintas cáscaras de frutas y vegetales empleando diferentes sustratos SERS. El método descrito empleando el *sustrato 1* (AgNPs-gel de agar), ha resultado eficiente para la extracción del plaguicida sobre las cáscaras de frutas y vegetales comparados con los LD previamente reportados. El LD logrado en este trabajo para el tiram en cáscaras de tomate fue 30 veces más bajo que el mejor valor informado utilizando sustratos SERS flexibles [18] y si se comparan los resultados obtenidos para la detección en cáscara de manzana esto resulta aún mejor en relación con los límites de detección reportados, siendo este ~ 100 veces más bajo [19].

Tabla 7.4. Comparación de los diferentes sustratos SERS reportados para la detección de tiram en cáscaras de frutas y vegetales.

Sustratos SERS	Longitud de onda de excitación (nm)	LD (ng/cm ²)	Cáscaras de frutas y vegetales	Referencias
Película de nanoislas de Au	785	5	Manzana	[20]
Microesferas de Fe ₃ O ₄ recubiertas con nanovarillas de Au	785	100*	Manzana	[20]
NPs de óxido de silicio (IV) recubiertas por nanocapas de Ag	785	38	Manzana	[20]
AuNPs sobre cinta adhesiva comercial	633	0,24	Verduras verdes, pepinos, naranja y manzana	[19]
Nanoláminas de AgNPs sobre TiO ₂	514,5	240	Manzana	[19]
Au@Ag NPs	532	1,46	Manzana, uva, pera y durazno	[19]

NPs Au@Ag	532	7,23	Mango	[19]
AgNPs en papel de filtro	785	36	Tomate	[19]
AgNPs en papel de filtro	785	24	Manzana	[19]
AgNPs en papel de filtro	785	7,2	Banana	[19]
Nanovarillas de Ag sobre polidimetilsiloxano	785	2,4	Manzana	[19]
AgNPs en papel de filtro	785	4,6261	Manzana	[19]
AgNPs en papel de filtro	785	5,1799	Pera	[21]
AgNPs en papel de filtro	785	5,7061	Uva	[21]
AgNPs en matriz de polidimetilsiloxano 3D	633	10	Pepino y uva	[21]
AgNPs en matriz de polidimetilsiloxano 3D	633	1,6	Manzana	[21]
AgNPs en nanocelulosa	785	0,5	Repollo y manzana	[22]
Matriz de nanopartículas de Au@Ag intercalada entre cinta adhesiva de polímero acrílico y película de tereftalato de polietileno	633	5	Manzana, tomate y Pepino.	[18]
AgNPs en gel*	647,1	0,60	Tomate, berenjena y morrón verde.	<i>Esta Tesis. Sustrato 1</i>
AgNPs gel*	647,1	0,060	Cereza	<i>Esta Tesis. Sustrato 1</i>
AgNPs gel*	647,1	0,012	Frutilla	<i>Esta Tesis. Sustrato 1</i>
AgNPs gel*	647,1	0,0060	Manzana	<i>Esta Tesis. Sustrato 1</i>

* Concentraciones superficiales detectadas

El *sustrato 1* (AgNPs-gel de agar) fue evaluado eficientemente frente al fungicida, mostrando gran homogeneidad y reproducibilidad en los resultados. En cuanto a la extracción y detección de residuos de plaguicidas sobre cáscaras de frutas y vegetales, la plataforma resultó eficiente permitiendo detectar el plaguicida por debajo de los LD previamente informados por diferentes autores y además, por los límites máximos de detección establecidos por entes de regulación nacionales e internacionales. Si bien se observaron variaciones en la sensibilidad para la detección en diferentes frutas y vegetales, los mismos fueron atribuidos a las diferencias en las propiedades superficiales de cada una de las cáscaras y la fuerza de interacción entre el tiram y cada una de ellas. Adicionalmente, se demostró mediante tomas de espectros SERS periódicas a partir de una de las plataformas desarrolladas y empleada para extraer el plaguicida que el sustrato es capaz de conservar la señal SERS del analito en el tiempo por lo menos durante 10 meses.

Mediante el análisis de los espectros FTIR, Raman y SERS del plaguicida y con el apoyo de bibliografía previamente informada, se logró establecer una asignación vibracional de la molécula de tiram. Así mismo, se determinó mediante los cambios observados en los espectros Raman y los espectros SERS del analito el mecanismo de adsorción de la molécula de tiram sobre la superficie metálica, resultando en la escisión del enlace S-S para quimisorberse a la plata.

El *sustrato 2* (AgNSs) ha sido evaluado exitosamente frente al plaguicida, permitiendo detectar trazas de tiram. Los valores mínimos de concentración superficial en donde se observan señales de tiram en los espectros SERS del plaguicida extraídos de las cáscaras de frutas y vegetales empleando el *sustrato 2* fueron comparables al *sustrato 1*, pero mostraron un grado mayor de dispersión y por lo tanto menor reproducibilidad en las medidas. La plataforma ha mostrado, a pesar de los intentos de optimizar las condiciones de trabajo, mayor variabilidad que el sustrato 1. Esto puede ser atribuido al efecto de las diferentes variables asociadas al proceso, entre ellas, el tiempo de secado del sustrato, la difusión del analito sobre el papel de filtro al ser sembrado y la oxidación de la plata (detectada a través de la señal Raman atribuible al enlace Ag-O) al estar en constante contacto al aire, por lo que no fue posible conservar

la señal en el tiempo. A pesar de que se hicieron esfuerzos por realizar medidas cuantitativas o semicuantitativas con el *sustrato 2*, esto no fue posible.

Los sustratos SERS desarrollados para la detección de tiram fueron muy promisorios para el estudio de trazas del plaguicida presentes en cáscaras de frutas y vegetales, permitiendo extraer y detectar el agroquímico ensayado.

7.6. Referencias

- [1] Sharma, V. K.; Aulakh, J. S. y Malik, A. K. *J. Environ. Monit.*, **2003**, 5, 717–723.
- [2] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-934-2010-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>. Consultado en abril del 2022.
- [3] Environmental Protection Agency. <https://www.epa.gov/pesticide-tolerances/pesticide-types-index>. Consultado en abril del 2022.
- [4] European Commission. https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/maximum-residue-levels_en. Consultado en abril del 2022.
- [5] Coleman, M. M.; Koenig, J. L., y Shelton, J. R. *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* **1974**, 12, 1001–1013.
- [6] Mdluli, P. S.; Sosibo, N. M.; Revaprasadu, N.; Karamanis, P. y Leszczynski, J. *J. Mol. Struct.* **2009**, 935(1–3), 32–38.
- [7] Kang, J. S.; Hwang, S. Y.; Lee, C. J. y Lee, M. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, 23, 1604–1610.
- [8] Guerrini, L.; Jurasekova, Z.; Domingo, C.; Pérez-Méndez, M.; Leyton, P.; Campos-Vallette, M.; Garcia-Ramos, J. V. y Sánchez-Cortés, S. *Plasmonics*. **2007**, 2, 147–156.
- [9] Sánchez-Cortés, S.; Vasina, M.; Francioso, O. y García-Ramos, J. V. *Vib. Spectrosc.* **1998**, 17, 133–144.
- [10] Koh, T. S. *Spectrochim. Acta A.* **1995**, 51, 2177–2192.
- [11] Jensen, K. A.; Dahl, B. M.; Nielsen, P. H. y Borch, G. *Acta Chem. Scand.* **1972**, 26, 2241–2254.
- [12] Mylrajan, M. *J. Mol. Struct.* **1995**, 348, 257–260.
- [13] Narayanan, V. A.; Begun, G. M.; Stokes, D. L., Sutherland, W. S., y Vo-Dinh, T. *J. Raman Spectrosc.* **1992**, 23, 281–286.
- [14] Isanov, E.; Ando, R. A. y Corio, P. *Vib. Spectrosc.* **2016**, 87, 116–122.
- [15] Hussain, N.; Pu, H. y Sun, D-W. *Food Chem.* **2021**, 350, 129025.
- [16] Long, G. L. y Winefordner, J. D. *Anal. Chem.* **1983**, 55(7), 712–724.

-
- [17] Thomsen, V.; Schatzlein, D. y Mercurio, D. *Spectroscopy*. **2003**, *18*, 112–114.
- [18] Wang, K.; Sun, D-W.; Pu, H. y Wei Q. *Talanta*. **2021**, *223*, 121782, 1–10.
- [19] Xu, M.; Gao, Y.; Han, X. X. y Zhao, B. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6719–6726.
- [20] Pang, S.; Yang, T. y He, L. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *85*, 73–82.
- [21] Wang, P.; Wu, L.; Lu, Z.; Li, Q.; Yin, W.; Ding, F. y Han, H. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 424–2431.
- [22] Chen, J., Huang, M., Kong, L., y Lin, M. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *205*, 596–600.

CAPÍTULO 8

COMPUESTOS

BENZIMIDAZÓLICOS

8.2. Introducción

El tiabendazol (TBZ) y el carbendazim (CBZ) (**Figura 8.1.**) son fungicidas que pertenecen al grupo de los compuestos bencimidazólicos, conforme a la clasificación de grupos funcionales de los plaguicidas detallado en el capítulo 3 [1]. Ambos compuestos son extensamente empleados para el control de hongos y mohos en tratamientos de frutas y vegetales, principalmente en tratamientos postcosecha, ya que los mismos actúan interfiriendo el proceso de división celular de las células fúngicas. En la **Tabla 8.1.** se proporcionan los límites máximos de residuos (LMR) de los plaguicidas estudiados en este capítulo establecidos por los distintos organismos de regulación nacionales e internacionales [2,3,4].

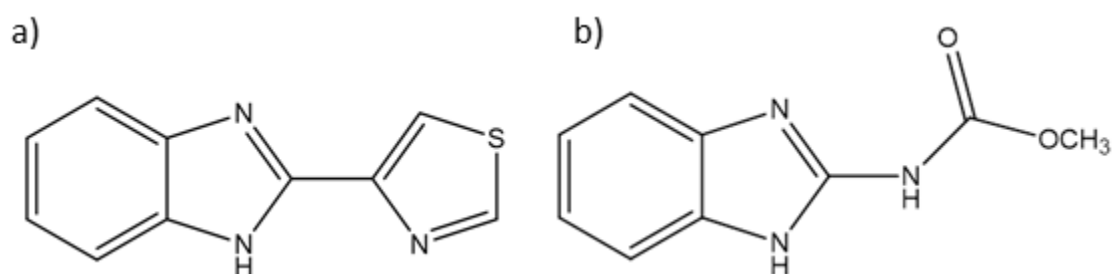


Figura 8.1.: Estructura molecular del a) tiabendazol (TBZ) y b) carbendazim (CBZ).

Tabla 8.1.: Valores establecidos como LMR para los fungicidas tiabendazol y carbendazim según diferentes organismos de regulación.

FUNGICIDAS	TIABENDAZOL			CARBENDAZIM		
	SENASA (mg/Kg)	EPA (mg/Kg)	UNION EUROPEA (mg/Kg)	SENASA (mg/Kg)	EPA (mg/Kg)	UNION EUROPEA (mg/Kg)
Frutas y vegetales						
Manzana/ Pera	3	12	4	1	1	0,2
Morrón Verde	-	-	0,01	0,1	0,1	0,1
Tomate	-	-	0,01	1	1	0,3
Berenjena	-	-	0,01	0,5	-	-
Frutilla	-	5	0,05	2	2	0,1

8.3. Preparación de muestras

➤ Espectroscopias UV-Visible y FTIR

Para determinar posibles efectos de resonancia o prerresonancia Raman a las longitudes de onda de excitación de los láseres disponibles, fueron estudiados los espectros de absorción UV-Vis de los plaguicidas. Para ello, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de TBZ en metanol ($5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-6}$ M) y de CBZ en etanol ($1,0 \times 10^{-5}$ M); los espectros UV-Vis fueron adquiridos en los rangos de 205-900 y 330-900 nm, respectivamente. Adicionalmente, se caracterizaron los sólidos de los fungicidas mediante la técnica espectroscópica FTIR mediante la toma de sus espectros vibracionales en la zona de 4000-400 y 600-50 cm^{-1} ; para este fin se prepararon pastillas de los analitos con KBr y polietileno, respectivamente. Los espectros obtenidos mediante ambas técnicas se compararon con bibliografía previamente reportada.

➤ Espectroscopia Raman y SERS

Para la obtención de los espectros Raman, se prepararon capilares sellados a la llama conteniendo los plaguicidas sólidos como también los solventes empleados en la preparación de las soluciones (metanol y acetona). Los espectros de las muestras fueron tomados empleando el objetivo de 10x (0,25 NA). Para evaluar los sustratos desarrollados mediante espectroscopia SERS, se prepararon inicialmente las soluciones madres de ambas sustancias; $1,0 \times 10^{-2}$ M de TBZ en metanol y $1,0 \times 10^{-3}$ M de CBZ en acetona. A partir de las soluciones madres se prepararon mediante diluciones soluciones de las siguientes concentraciones: $1,0 \times 10^{-2}$, $5,0 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-3}$, $7,5 \cdot 10^{-4}$, $5,0 \times 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-4}$, $7,5 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-6}$ y $1,0 \times 10^{-6}$ M.

Para evaluar la eficiencia del primer sustrato desarrollado, constituido por AgNPs soportado sobre gel de agar (*sustrato 1*) frente a los fungicidas, se cortaron geles de 1 cm^2 y se contaminaron cada uno de ellos con 20,0 μL de las soluciones de diferentes concentraciones preparadas en el día de TBZ y CBZ. Posteriormente los geles contaminados colocados en portaobjetos de microscopio se dejaron deshidratar durante aproximadamente 24 h al abrigo de la luz. Adicionalmente, se colectó el espectro SERS blanco del *sustrato 1* (sin analito), para ello se colocaron en los sustratos de gel de agar 20,0 μL del solvente empleado para cada uno de los fungicidas, y posteriormente se dejó

deshidratar durante 24 h. Inicialmente, el sistema formado por AgNPs inmovilizado sobre gel de agar contaminado con TBZ fue estudiado con las distintas longitudes de ondas de excitación disponibles (476,5; 496,5 y 514,5 nm provistas por el láser de Ar⁺ y 647,1 y 676,4 nm proporcionado por el láser de Kr⁺) para determinar la longitud de onda de excitación más eficiente para intensificar las señales SERS del TBZ. Con este fin, se seleccionó un sustrato SERS de gel agar contaminado con 4,0 µg/cm² de TBZ deshidratado durante 24 h y se midieron los espectros SERS; esto permitió determinar las condiciones óptimas para realizar las medidas SERS.

Para determinar la eficiencia del segundo sustrato SERS flexible, basado en AgNSs impregnado sobre papel de filtro de celulosa (*sustrato 2*) frente a los fungicidas, primero los sustratos fueron cortados en cuadrados de 1 cm² e inmovilizados sobre los portaobjetos de microscopio con ojalillos plásticos autoadhesivos. Seguidamente se colocó 10,0 µL de las distintas soluciones de diferentes concentraciones de TBZ y CBZ sobre los sustratos; finalmente se dejó secar al abrigo de la luz durante ~ 1 h antes de realizar la toma de los espectros SERS. De la misma manera que para el *sustrato 1*, se evaluó el blanco *del sustrato 2* (sin analito). Para ello se colocó 10,0 µL del solvente empleado para preparar las soluciones de cada plaguicida sobre los sustratos y se dejaron secar durante ~ 1 h.

La preparación de muestras empleadas para la detección de los fungicidas sobre cáscaras de frutas y vegetales realizadas para cada uno de los sustratos se describirá en este capítulo en la **sección 8.3**.

8.4. Resultados y discusión

A lo largo de esta sección se expondrán los resultados obtenidos y la discusión de cada técnica empleada para ambos plaguicidas (tiabendazol y carbendazim). Para facilitar su lectura se dividieron a su vez de acuerdo al fungicida estudiado.

8.4.1. Espectroscopias UV-Vis y FTIR

8.4.1.1. Tiabendazol

En la **Figura 8.2**. se muestran los espectros UV-Vis obtenidos para el TBZ en metanol en diferentes concentraciones ($5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-6}$ M). En el espectro electrónico se observan fuertes absorciones en ~ 206, 235, 242 y 299 nm. El espectro

UV-Vis del TBZ ha sido estudiado experimentalmente por varios autores empleando distintos solventes como metanol [1, 5] y cloroformo [6]. Recientemente, se ha reportado e interpretado el espectro de absorción UV-Vis del TBZ en términos de las transiciones electrónicas mediante el análisis de orbitales naturales de enlace (NBO) [7], mostrando consistencia con los resultados experimentales de este trabajo. El espectro UV-Vis sugiere la ausencia de resonancia o prerresonancia del analito a las longitudes de ondas de excitación de trabajo. De modo complementario, se ha determinado a partir de los espectros electrónicos obtenidos a diferentes concentraciones para el TBZ el coeficiente de extinción ($\epsilon_{299\text{nm}}=24172\pm 87 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $R^2=0,99993$) obtenido para la absorción de 299 nm (**Figura 8.3.**).

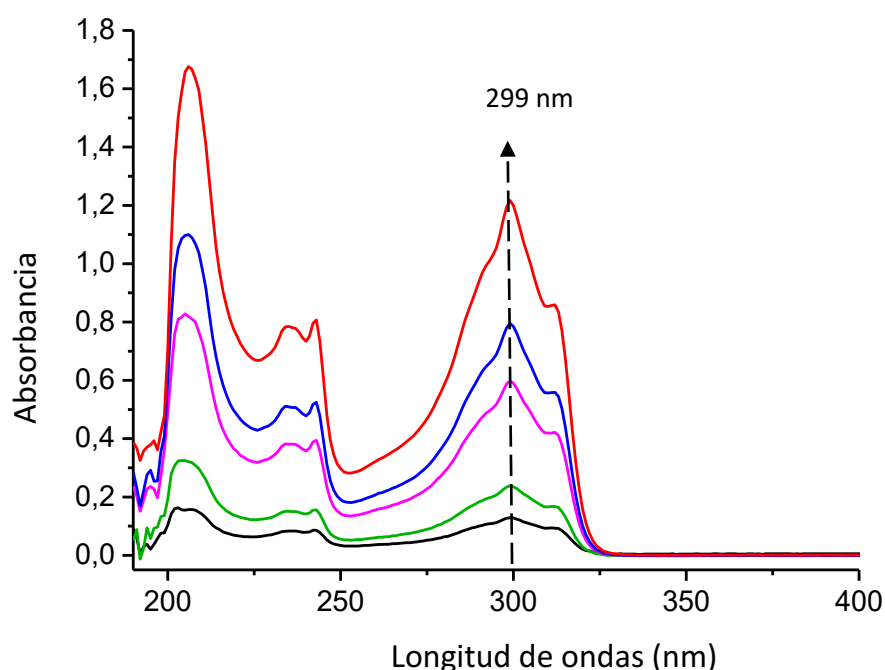


Figura 8.2.: Espectros UV-Vis de soluciones de TBZ en metanol de diferentes concentraciones. $5,0 \times 10^{-5}$ M (línea roja); $3,3 \times 10^{-5}$ (línea azul); $2,5 \times 10^{-5}$ (línea rosa); $1,0 \times 10^{-5}$ (línea verde) y $5,0 \times 10^{-6}$ M (línea negra). (*Cut off* del metanol: 205 nm).

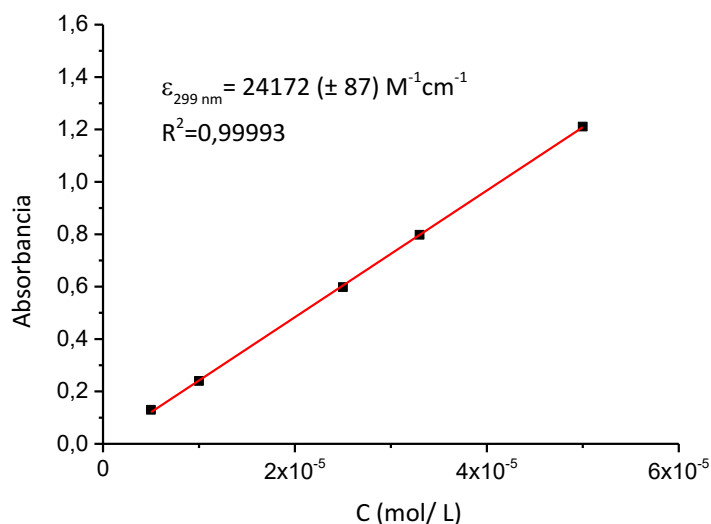


Figura 8.3.: Gráfico de absorbanza en función de las concentraciones de TBZ. Coeficiente de extinción a 299 nm $\epsilon=24172\pm87 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ obtenido a partir del ajuste lineal ($R^2=0,99993$).

En la **Figura 8.4.** se muestra el espectro FTIR de TBZ sólido medido en la región de 4000-600 cm^{-1} . Tabañez y col. [7] analizaron el espectro teórico obtenido a partir de métodos computacionales y determinaron que el espectro teórico mostraba gran concordancia con el espectro IR experimental en la zona de 1800-800 cm^{-1} . En la **Tabla 8.3.** que se presenta en la próxima sección se indican los números de ondas vibracionales obtenidos experimentalmente y reportados para el analito, con las asignaciones tentativas propuestas para el plaguicida.

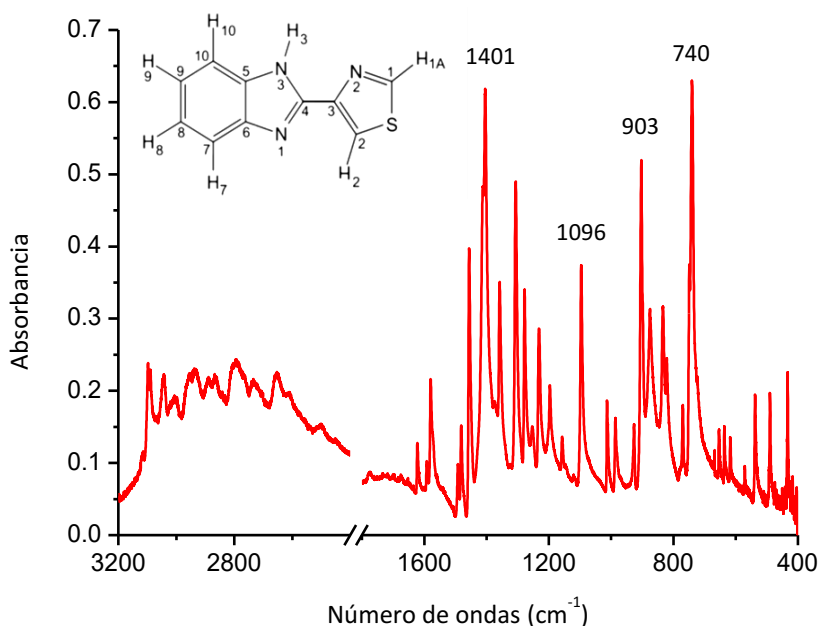


Figura 8.4: Espectro FTIR del TBZ sólido. Región: 3200-2400 y 1800-400 cm^{-1} . Barridos: 64; Resolución: 0,50 cm^{-1} .

En la **Figura 8.5.** se muestra el espectro FTIR del TBZ en la región de 600-150 cm^{-1} . Según cálculos teóricos reportados [7] para el espectro FTIR del TBZ, la banda observada en $\sim 270 \text{ cm}^{-1}$ está asociada a la torsión del grupo imidazol; mientras que las bandas en $\sim 490, 433$ y 330 cm^{-1} son asignadas a las torsiones de los grupos tiazol, fenil y a las deformaciones de los anillos respectivamente.

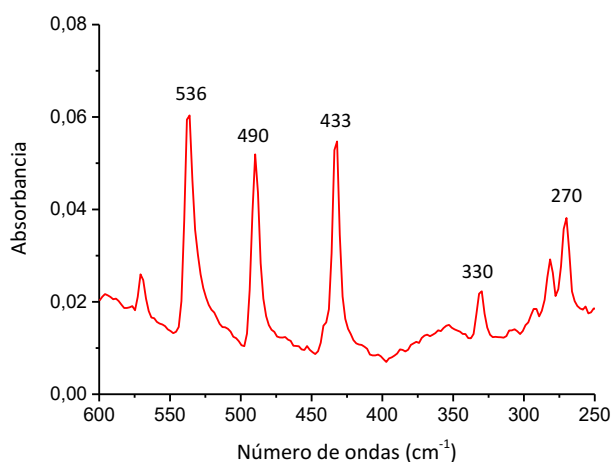


Figura 8.5.: Espectro FTIR del TBZ sólido. Región: 600-250 cm^{-1} . Barridos: 32; Resolución: 4 cm^{-1} .

8.4.1.2. Carbendazim

En la **Figura 8.6.** se muestra el espectro UV-Vis de una solución etanólica $1,0 \times 10^{-5}$ M de CBZ medido en la región de 250-400 nm, en la que se observa el máximo de absorción en 287 nm. El espectro UV-Vis sugiere que no se esperan efectos Raman de resonancia o prerresonancia cuando se emplean láseres visibles como fuente de excitación.

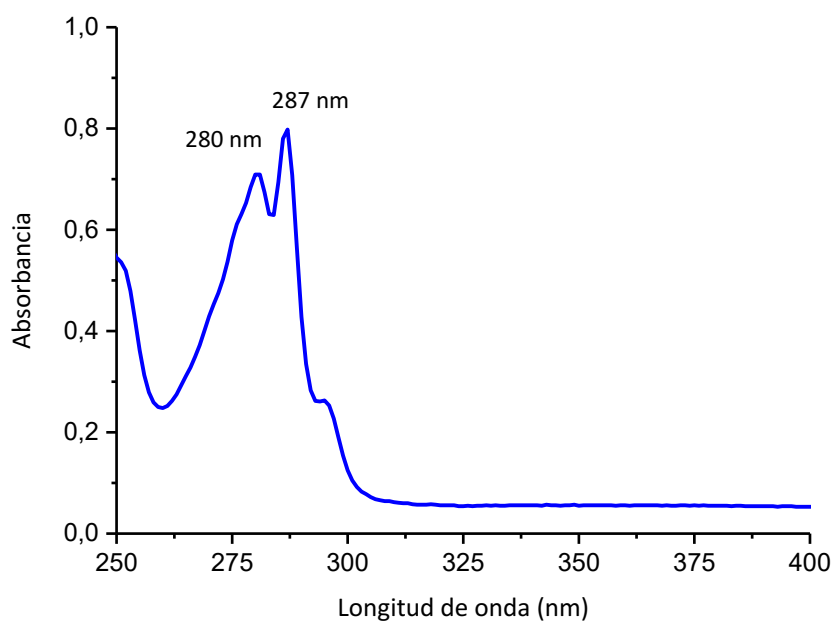


Figura 8.6.: Espectro de absorción UV-Vis de CBZ en etanol. (*Cut off* de la acetona: 210 nm).

En la **Figura 8.7.** se muestra el espectro FTIR de CBZ (muestra sólida) medido en la región de $4000-400 \text{ cm}^{-1}$. El espectro vibracional y las asignaciones de CBZ se encuentra reportadas en la literatura [8,9,10] y en esta Tesis se discutirán más adelante de manera conjunta con el espectro Raman.

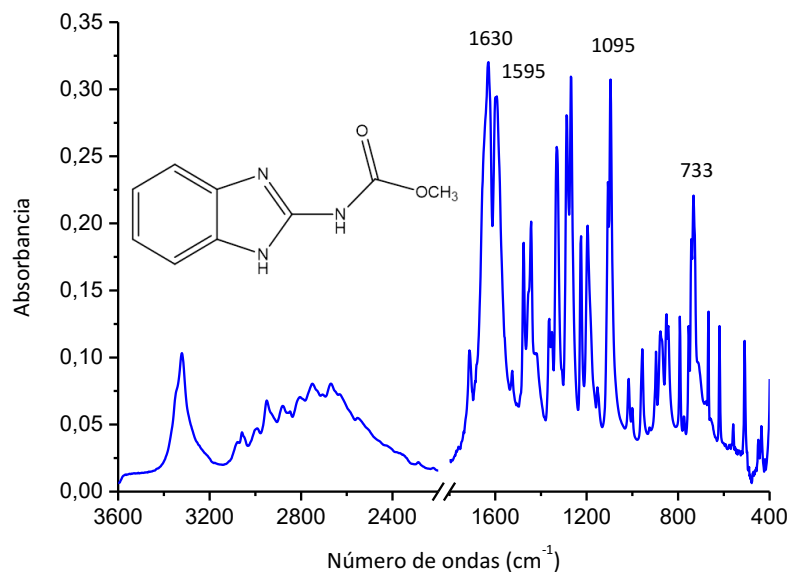


Figura 8.7.: Espectro FTIR del CBZ sólido en la región 3600-2200 y 1800-400 cm^{-1} . Barridos: 64; resolución: 4 cm^{-1} .

8.4.2. Evaluación de los sustratos SERS frente a compuestos benzimidazólicos

A lo largo de esta sección se hará referencia a la evaluación de los dos sustratos desarrollados frente a los analitos en estudio, con el fin de extender posteriormente su estudio a la detección de residuos de estos plaguicidas sobre cáscaras de frutas y vegetales.

8.4.2.1. Tiabendazol

Sustrato 1: Gel agar-AgNPs

Como se describió anteriormente, se determinó la longitud de onda de excitación más eficiente para las medidas SERS del *sustrato 1* conteniendo TBZ. Para ello se exploró un sustrato de gel de agar deshidratado y contaminado con $\sim 4,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ con diferentes líneas de excitación. Como se puede observar en la **Figura 8.8.** las intensidades de las señales SERS de TBZ obtenidas fueron mayores para las longitudes de ondas de excitación proporcionadas por el láser de Kr^+ (647,1 y 676,4 nm) siendo más intensa la línea de 647,1 nm. Todos los espectros SERS de TBZ fueron adquiridos empleando 100 mW como la potencia de salida del láser, a excepción de la longitud de onda de excitación

de 476,4 con la que se trabajó a 50 mW por la gran fluorescencia de los espectros. Por esta razón, se seleccionó la línea roja (647,1 nm) para llevar a cabo todas las medidas Raman y SERS.

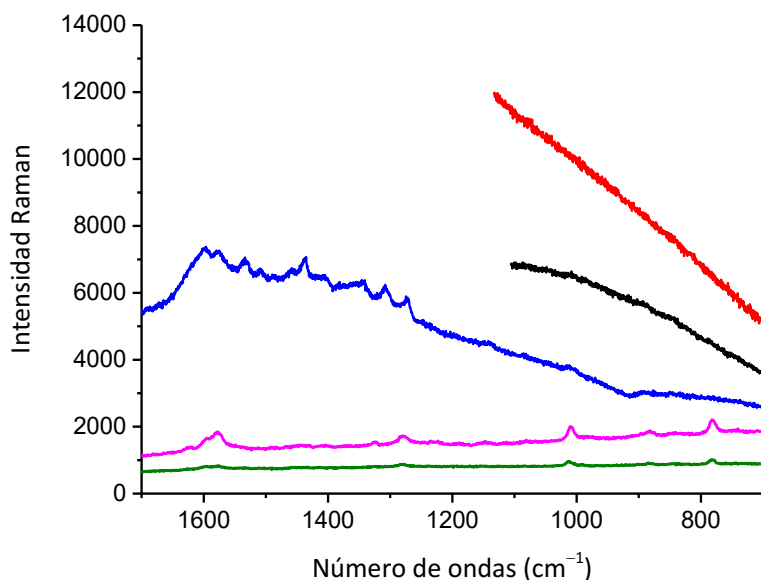


Figura 8.8.: Espectros SERS de TBZ obtenidos para un sustrato de gel de agar deshidratado conteniendo $\sim 4,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ medidas a diferentes longitudes de onda de excitación proporcionadas por el láser de Ar^+ 476,5 nm (línea roja); 496,5 nm (línea negra) y 514,5 nm (línea azul), y el láser de Kr^+ 647,1 nm (línea rosa) y 676,4 nm (línea verde). Potencia de salida del láser de 100 mW (496,5; 514,5; 647,1 y 676,4 nm) y 50 mW (476,5 nm); tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Luego de determinar la longitud de onda más eficiente para realizar las medidas Raman y SERS de TBZ, se colectó el espectro SERS del blanco del *sustrato 1* (sin analito) empleando el láser rojo (647,1 nm), el cual no presento señales que pudieran interferir en los estudios posteriores. Seguidamente, se determinó la eficiencia del *sustrato 1* frente al TBZ. Para ello, se midieron los espectros SERS de TBZ tomando entre 5-10 spots por cada gel deshidratado. Los gels fueron contaminados intencionalmente con 20,0 μL de diferentes concentraciones de TBZ en metanol ($1,0 \times 10^{-2}$; $5,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-3}$, $7,5 \times 10^{-4}$, $5,0 \times 10^{-4}$, $2,5 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-4}$, $7,5 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-6}$ M). En la **Figura 8.9.** se pueden observar los espectros SERS representativos para cada concentración de TBZ, donde se observa que la señales decaen a medida que disminuye la concentración superficial sembrada.

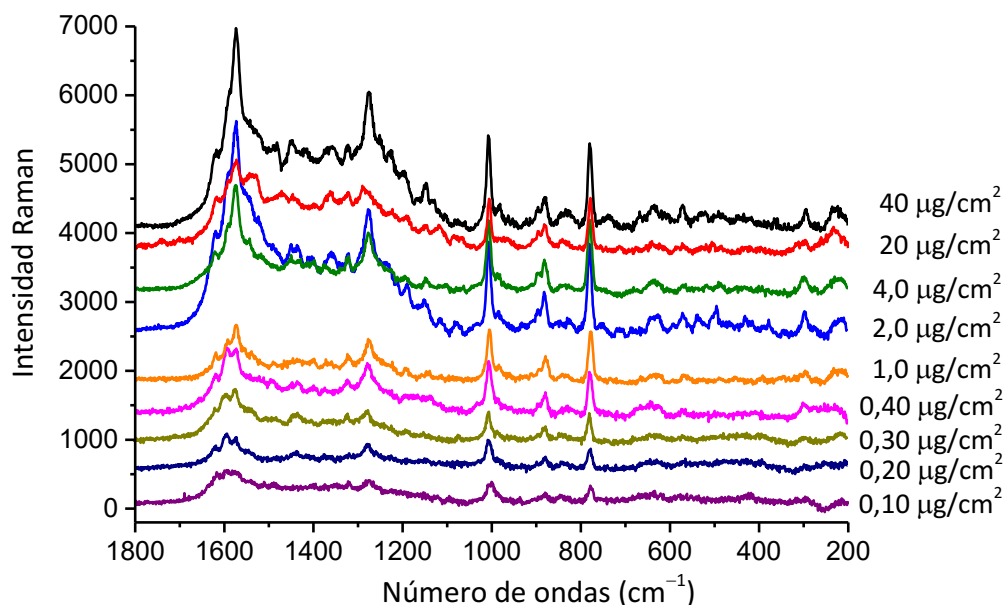


Figura 8.9.: Espectros SERS representativos de TBZ sobre geles de agar deshidratados y sembrados con 20,0 μL de diferentes concentraciones de TBZ. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Como se discutirá más adelante, las intensidades relativas de algunas bandas Raman parecen cambiar en los espectros SERS no solo con la concentración superficial de TBZ sino también con el spot medido. Además, también se observaron fluctuaciones en la intensidad de varias bandas durante el tiempo de exposición del láser, principalmente en la región comprendida entre 1275 y 1700 cm^{-1} . Sin embargo, las bandas presentes en 1009 y 782 cm^{-1} se mantuvieron estables durante la exposición al láser y no mostraron cambios significativos entre los espectros recolectados aleatoriamente. Por estas razones, estas señales se seleccionaron para posteriores análisis semicuantitativos. Adicionalmente, como se mencionó en el capítulo 6 el blanco del *sustrato 1* presenta una banda $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ que dificulta la medida del área de la banda del TBZ ubicada $\sim 1009 \text{ cm}^{-1}$, especialmente a de bajas concentraciones del analito. Por este motivo, se seleccionó la banda en 782 cm^{-1} para realizar los análisis posteriores.

A lo largo de la Tesis, se sintetizaron en diferentes oportunidades las AgNPs (diferentes “batch”) y con ellas también se fabricaron distintos sustratos SERS lo que permitió explorar la existencia de variaciones de los diferentes sustratos frente al TBZ, fundamentalmente ocasionadas por usar *batch* diferentes de AgNPs. Como se mencionó

en el capítulo 5, las dispersiones de AgNPs permanecen relativamente estables durante un periodo de 1 año, por lo que se prepararon geles de agar empleando dispersiones de NPs que fueron conservadas en la heladera. Es decir, cada sustrato es distinto ya que puede provenir de Ag NPs preparadas en diferentes síntesis o que haya pasado ya un tiempo de su preparación. Por este motivo en cada experiencia se realizaron curvas de calibraciones con el gel fresco. Para ello se graficó el área promedio calculada como el área bajo la curva de la banda seleccionada como representativa de TBZ, a 782 cm^{-1} , frente a las diferentes concentraciones superficiales evaluadas para cada uno de sustratos preparados, ya sea por pertenecer a un “batch” de AgNPs diferente o por haber transcurrido diferentes tiempos desde su preparación. Como se comentó anteriormente en el capítulo 6, dado que la intensidad de SERS es proporcional al número de moléculas adsorbidas en el sustrato, el gráfico presentado en la **Figura 8.10.** puede considerarse como una isoterma de adsorción [11]. En esta Figura se presentan las isotermas de adsorciones medidas como el área de la banda a 782 cm^{-1} en el espectro SERS frente a las concentraciones superficiales de TBZ sembradas en los distintos sustratos desarrollados en tiempos diferentes. Adicionalmente, en la figura se puede observar la variabilidad de las medidas como la desviación estándar (SD) de los *spots* tomados aleatoriamente (5-10 spots) mediante la barra de error para cada concentración de TBZ. Como se puede observar en la **Figura 8.10.**, las señales obtenidas de los diferentes sustratos desarrollados presentan un comportamiento semejante, aunque se observan variaciones con respecto a las áreas medidas

recomendable para las determinaciones semicuantitativas realizar la curva de calibración junto con las medidas a realizar para la detección del analito, empleando el mismo sistema (*batch* de nanopartículas y gel de agar), ya que se pueden presentar pequeñas variaciones en las intensidades relativas del analito. Por otro lado, esto no es necesario si el sustrato SERS se utiliza solo para realizar una prueba del tipo presencia-ausencia del analito, donde no es necesario determinar la cantidad de sustancia presente sino su presencia dentro de los límites de detección de la técnica.

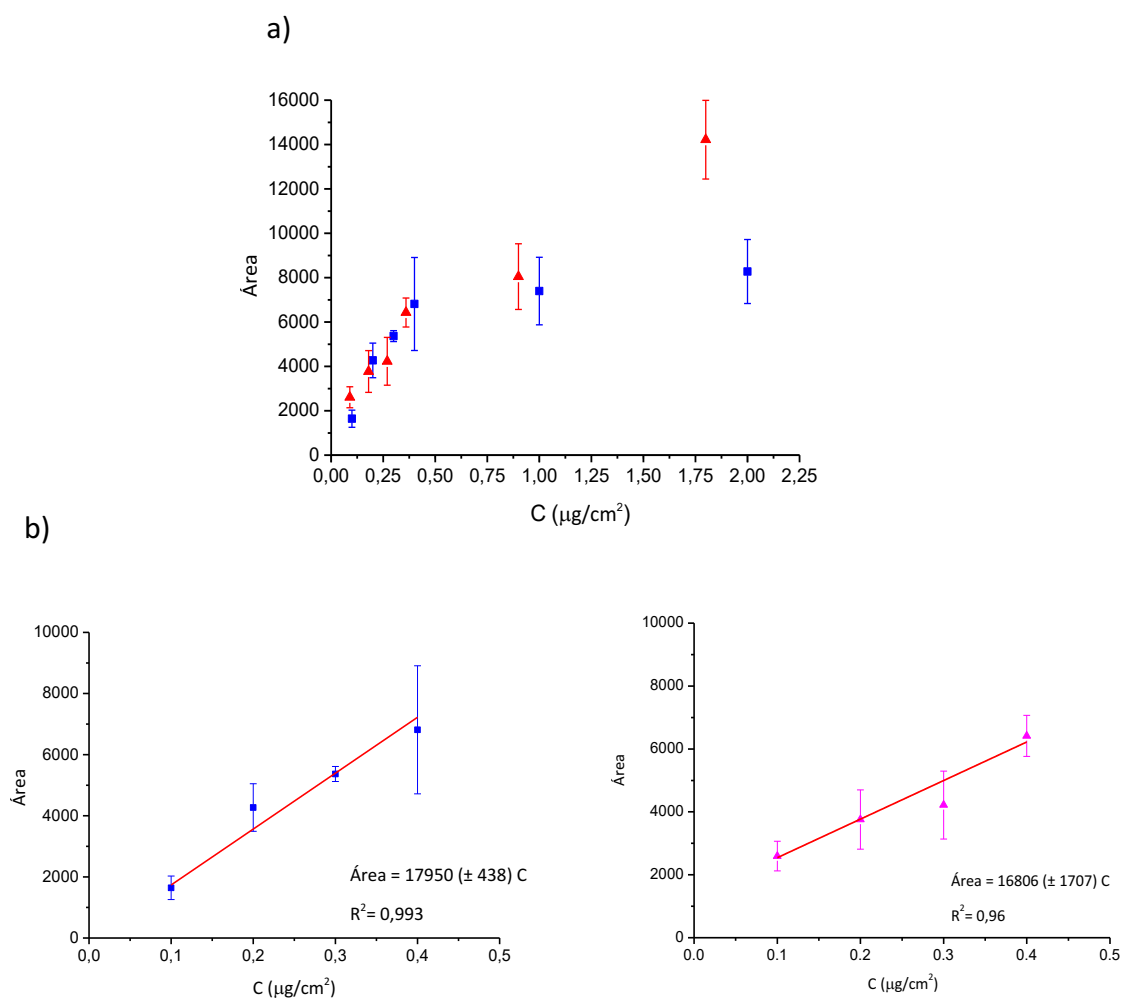


Figura 8.11: a) Ampliación de la zona lineal de la curva de calibración de dos sustratos SERS de gel de agar contaminados con diferentes concentraciones de TBZ. b) Regresión lineal para dos calibraciones llevadas a cabo con sustratos SERS de *batch* de AgNPs de diferentes días.

El LD de TBZ se calculó usando la ecuación 8.1. mencionada anteriormente en el capítulo 7, donde S_w corresponde a la desviación estándar de la intensidad SERS del blanco medida en el mismo intervalo de números de ondas, integrando la banda

representativa de TBZ y “b” representa la pendiente de las curvas de calibración en la región lineal descrita anteriormente [12]. El valor de LD obtenido para ambas curvas de calibración que se muestran en la **Figura 8.11.b** fue de 30 ng/cm².

$$LD = \frac{3Sw}{b} \quad (8.1.)$$

Por otro lado, con el fin de determinar la uniformidad y fiabilidad de los sustratos frente al plaguicida se tomaron mapas SERS de los geles sembrados y deshidratados con diferentes concentraciones del fungicida. En la **Figura 8.12.** se muestra uno de los mapas SERS registrados, de 60 x 60 μm tomados cada 5 μm, de un sustrato SERS conteniendo 0,40 μg/cm² de TBZ. El área de cada espectro fue integrada entre 801-762 cm⁻¹ y representada mediante un histograma que muestra los 121 espectros tomados y ajustado con una curva normal. El análisis del mapa permitió estudiar la uniformidad del TBZ sobre el sustrato SERS flexible basado en AgNPs soportado en el gel de agar, determinando la fiabilidad del sustrato para el análisis de TBZ con tan solo pocas medidas (*spots*) SERS.

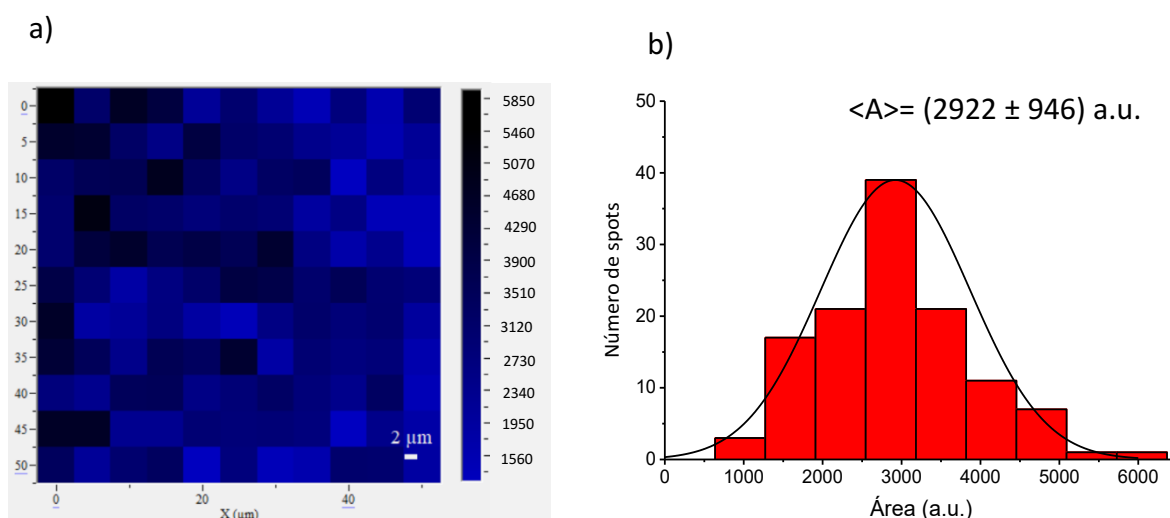


Figura 8.12.: a) Mapa SERS de (60 x 60 μm, tomado cada 5 μm) del sustrato de gel de agar deshidratado conteniendo 0,40 μg/cm² de TBZ. El área de cada espectro fue integrada entre 801 y 762 cm⁻¹. b) Representación del histograma de los 121 espectros tomados y ajustado con una curva normal <A>= (2922 ± 946) a.u. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 2 acumulaciones; 50x objetivo (0,75NA)).

Para comprender mejor el comportamiento del *sustrato 1*, se exploraron y analizaron otros factores como son el cambio en las señales SERS según el grado de deshidratación del *sustrato 1* conteniendo TBZ, su durabilidad en el tiempo (sin sembrar), y su capacidad para encapsular al analito y conservarlo junto con su respuesta SERS a lo largo del tiempo. Un mejor conocimiento del sustrato SERS permite optimizar las señales SERS, lo que permite a su vez disminuir el límite de detección del analito, en este caso, de TBZ.

La intensificación de las señales SERS del TBZ en el *sustrato 1* se ven afectadas por el grado de hidratación del sustrato SERS que contiene el analito. Cuando se llevan a cabo las medidas SERS se observa un gran aumento de las señales cuando el gel de agar se encuentra completamente deshidratado, lo que lleva aproximadamente 24 h. Este fenómeno se puede observar en la **Figura 8.13.**, donde se muestran dos espectros SERS de un mismo sustrato SERS de gel de agar que contiene $4,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ medido antes y después de la deshidratación. Este efecto de la deshidratación puede ser interpretado en términos de agregación de las AgNPs por el secado del gel, promoviendo la formación de *hot spots* que conducen a mayores intensificaciones del campo electromagnético, como se ha informado previamente en la literatura [13]. Las moléculas atrapadas en el gel se distribuyen homogéneamente en el gel deshidratado, al menos cuando la concentración de TBZ en la superficie es superior a $0,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

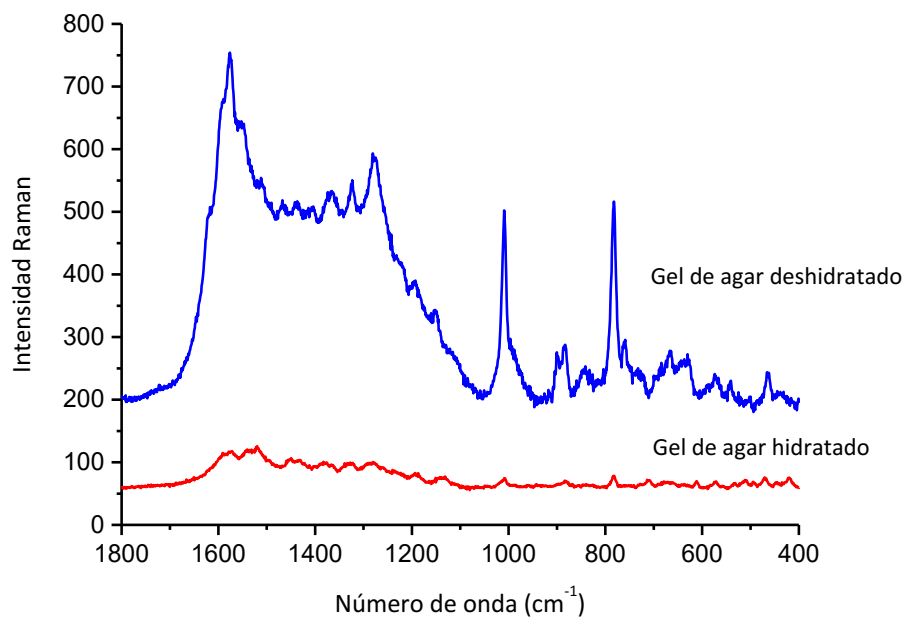


Figura 8.13: Espectros SERS de TBZ medidos sobre un sustrato SERS flexibles de gel de agar contaminados con $4,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ medidos recién preparado (hidratado) y luego de 24 h (deshidratado). (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Adicionalmente, se realizaron pruebas experimentales para determinar si la intensidad de las señales SERS del TBZ sobre el *sustrato 1* se modificaba al realizar las medidas de los espectros del lado donde se contaminó el gel agar o si se realizaba del lado opuesto. Para ello, se tomaron espectros SERS de ambos lados de un sustrato contaminado con $\sim 2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ. Este estudio permitió reforzar lo mencionado anteriormente, ya que las intensidades SERS del TBZ no se vieron afectadas, es decir, no depende del lado del sustrato que se mida, una vez atrapado el analito en la matriz de agar, el espectro puede recogerse de la superficie que estuvo en contacto con la muestra o del otro lado, indistintamente. En la **Figura 8.14.** se muestra los espectros SERS seleccionados de TBZ en sustrato de gel de agar que contiene $2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ recogidos de ambos lados del sustrato.

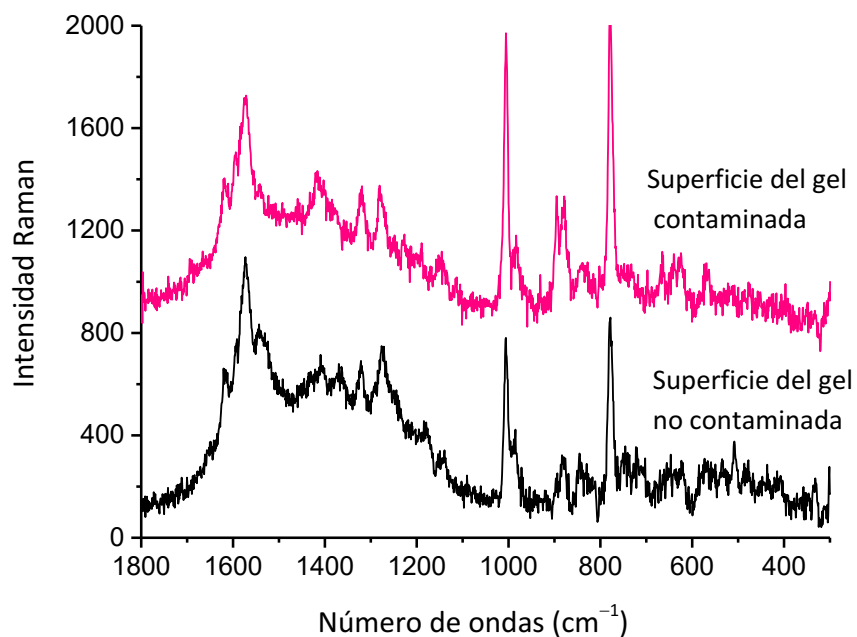


Figura 8.14.: Espectros SERS de TBZ medidos en la superficie del *sustrato 1* que se contaminó (línea rosa) y del lado opuesto no contaminado directamente (línea negra). (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Como se mencionó anteriormente, otro factor evaluado fue la capacidad del sustrato SERS contaminado para conservar las señales SERS en el tiempo. Para ello, un sustrato SERS seleccionado de gel de agar deshidratado que contenía $2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ se conservó a temperatura ambiente, protegido de la luz, y se midió periódicamente para evaluar su capacidad para conservar las señales SERS en el tiempo. Las señales SERS se observaron, con casi la misma intensidad, a lo largo de 22 meses después de su preparación y contaminación con el plaguicida (**Figura 8.15.**). La capacidad de conservar las moléculas atrapadas en el gel de agar, así como la capacidad de conservar su actividad SERS a largo tiempo, fue observado previamente para otros analitos, como el tiram mencionado en el capítulo anterior [14], y el clorhidrato de cocaína [15].

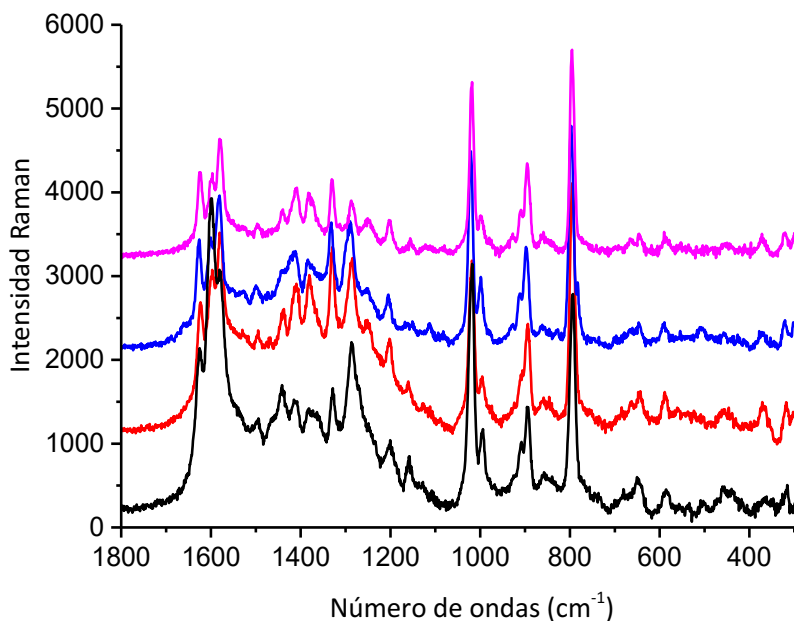


Figura 8.15.: Espectros SERS de TBZ de un *sustrato 1* deshidratado y contaminado con 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ medidos a diferentes tiempos. Sustrato SERS fresco (línea negra); luego de 5 meses (línea roja); 16 meses (línea azul) y 22 meses (línea rosa). (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Finalmente, se investigó el tiempo que el sustrato de gel de agar con AgNPs preparado en una caja de petri y conservado en la heladera puede ser utilizado como plataforma SERS. Luego de su preparación, el sustrato gel se conserva en heladera hasta su uso; el gel puede ser utilizado dentro de aproximadamente los 10 días de haber sido elaborado, como se mencionó en un trabajo anterior informado [14]. La **Figura 8.16.** muestra espectros SERS seleccionados de los sustratos de gel de agar con AgNPs de diferente antigüedad (todos conservados en la heladera), contaminados con 4,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ. Este análisis permitió determinar que a medida que el tiempo de conservación del sustrato fabricado aumenta, la respuesta SERS disminuye. Esto podría ser debido a que en la heladera el gel comienza a deshidratarse, lo cual provoca que el sustrato pierda parte de su capacidad encapsulante del analito comprometiendo su actividad SERS. Por esta razón, para obtener mejores resultados SERS es recomendable utilizar, como ya se mencionó anteriormente, al sustrato dentro de los 10 días posteriores a su preparación. El hecho de que deba emplearse un sustrato “fresco” para las medidas SERS puede ser

compensado por la gran estabilidad de la dispersión de AgNPs ya que las mismas se conservan estables por al menos un año (capítulo 5) y el sustrato se prepara de manera rápida y sencilla.

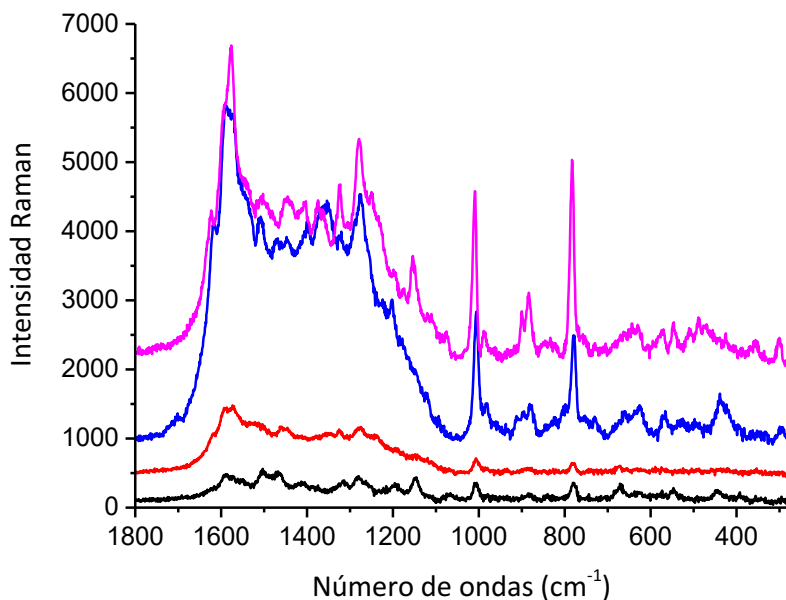


Figura 8.16.: Espectros SERS seleccionados de sustratos de gel de agar conteniendo AgNPs sembrados a diferentes tiempos de su preparación. Los sustratos SERS fueron contaminados con $4,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ para ser evaluado. Sustrato de 3 meses (línea negra), 2 meses (línea roja), 1 mes (línea azul) y sustrato SERS de 4 días de preparación (línea rosa). (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Sustrato 2: Papel de filtro-AgNSs

Para determinar la eficiencia del *sustrato 2* frente al tiabendazol, se impregnó el papel de filtro durante 15 s con la dispersión concentrada de AgNSs, y se dejó secar durante aproximadamente 5 min. Posteriormente se cortaron papeles de 1 cm^2 y se colocaron en un portaobjeto de microscopio sujetándolos con un papel de ojalillo plástico. Los sustratos se contaminaron con $10,0 \mu\text{L}$ de las distintas soluciones de TBZ de diferentes concentraciones ($1,0 \times 10^{-2}$; $5,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $5,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $1,0 \times 10^{-6}$ M). Se dejó evaporar el solvente durante aproximadamente 1 h para posteriormente realizar el registro de los espectros SERS tomando por lo menos 5-10 spots para cada concentración. Todas las medidas SERS se llevaron a cabo empleando

la longitud de onda de excitación de 647,1 nm con el objetivo 50x (0,75 NA). En la **Figura 8.17.** se puede observar los espectros representativos de TBZ para cada una de las concentraciones; el límite máximo alcanzado fue de $0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Como se observa en la Figura la mínima concentración detectada de TBZ con *sustrato 2* fue similar al detectado empleando el *sustrato 1*. De la misma manera al análisis realizado para el TBZ con el *sustrato 1*, se trazó una curva de calibración para el *sustrato 2* contaminado con diferentes concentraciones de TBZ. En la **Figura 8.18.** se observa la curva de calibración medida como el área de la banda presente a 782 cm^{-1} (integrada en el intervalo de 801 a 762 cm^{-1}) frente a la concentración superficial de TBZ sembrada para los sustratos SERS flexibles. Los espectros SERS fueron colectados en la región $1800\text{-}200 \text{ cm}^{-1}$ sobre el *sustrato 2*. Si bien, como se observa en la **Figura 8.18.b.** es posible trazar una región lineal en la curva de calibración en la zona de baja concentración de TBZ, debido a las grandes dispersiones obtenidas para este sustrato, se empleó únicamente el *sustrato 2* con el fin de determinar la presencia o ausencia del plaguicida.

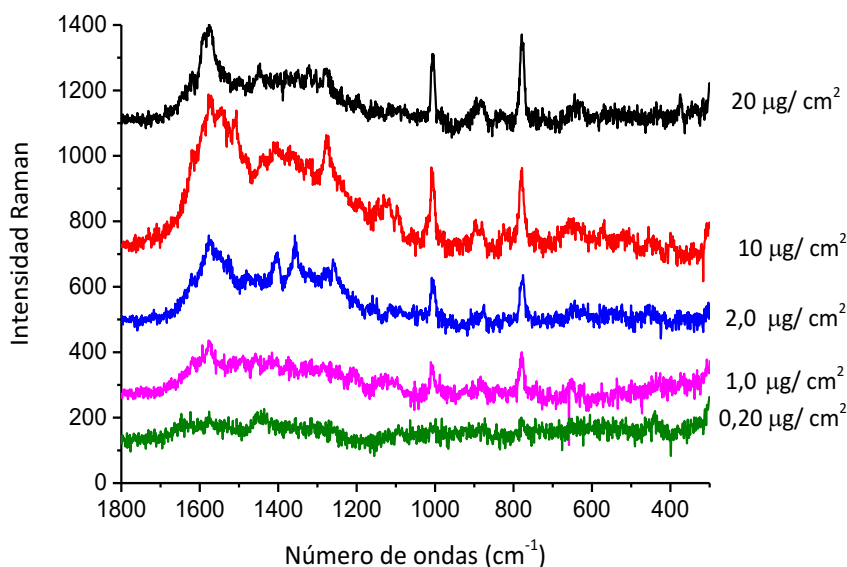


Figura 8.17: Espectros SERS de TBZ empleando sustrato SERS flexible basado en papel de filtro impregnado con las AgNSs. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

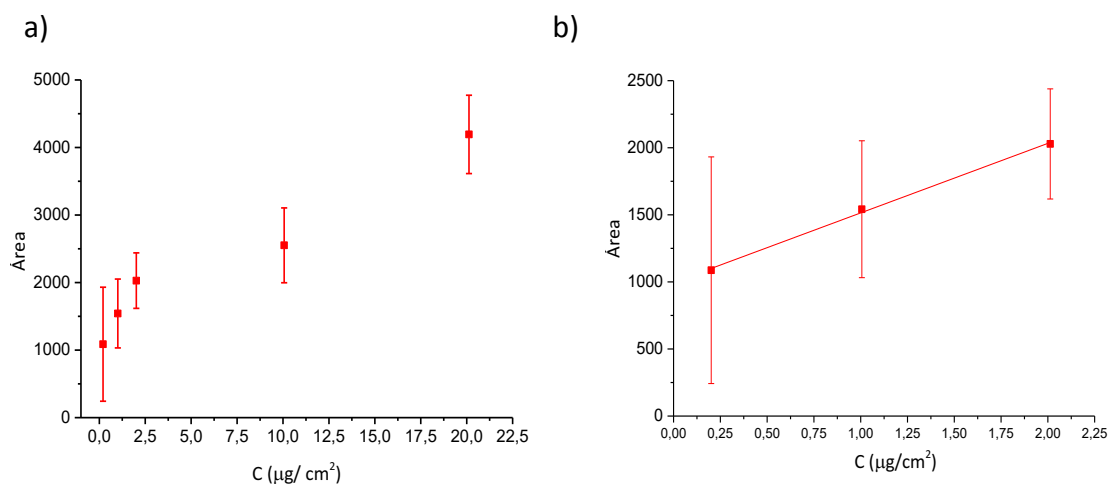


Figura 8.18.: a) Curva de calibración de TBZ empleando el *sustrato 2* (área integrada en el intervalo de 801 a 762 cm^{-1} frente a la concentración de TBZ sembrada). (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)). b) Representación lineal de la zona de baja concentraciones. Ajuste lineal; $A = 996 (\pm 30) + 518 (\pm 23) \times C$; $R^2=0,996$.

8.4.2.2. Carbendazim

Para evaluar el segundo plaguicida (CBZ) se procedió de la misma manera antes mencionada para el TBZ con ambos sustratos SERS desarrollados. Con este fin, el plaguicida sólido fue inicialmente evaluado mediante espectroscopia Raman empleando las diferentes longitudes de ondas de excitación visibles disponibles. Sin embargo, no fue posible obtener señales del analito con ninguna de ellas debido a la fluorescencia de la muestra sólida, que impidió visualizar las señales del CBZ. Estos resultados fueron atribuidos a la presencia de impurezas en el plaguicida sólido adquirido. Como se mencionó en el capítulo 2, el problema de la fluorescencia se atenúa utilizando líneas de excitación en el infrarrojo cercano como por ejemplo 1064,0 nm, donde es menos probable que se exciten las transiciones electrónicas de los analitos, de las impurezas o de los materiales utilizados para fabricar los sustratos SERS. Se ha conseguido medir y obtener el espectro FT-Raman del carbendazim sólido empleando la longitud de onda de excitación de 1064,0 nm mediante el empleo del espectrómetro FT-Raman adquirido recientemente por el CEQUINOR. El espectrómetro BRUKER; Modelo INVENIOR posee un módulo Raman con un láser IR de Nd:YAG de 1064,0 nm, con una potencia máxima de 500 mW y un detector de Ge criogénico, con portamuestras motorizado XYZ. En la **Figura**

8.19. se muestra el espectro FT-Raman de CBZ sólido junto con su espectro FTIR, y en la **Tabla 8.2.** se resumen las asignaciones tentativas del CBZ en base a la literatura reportada [16,17,18,].

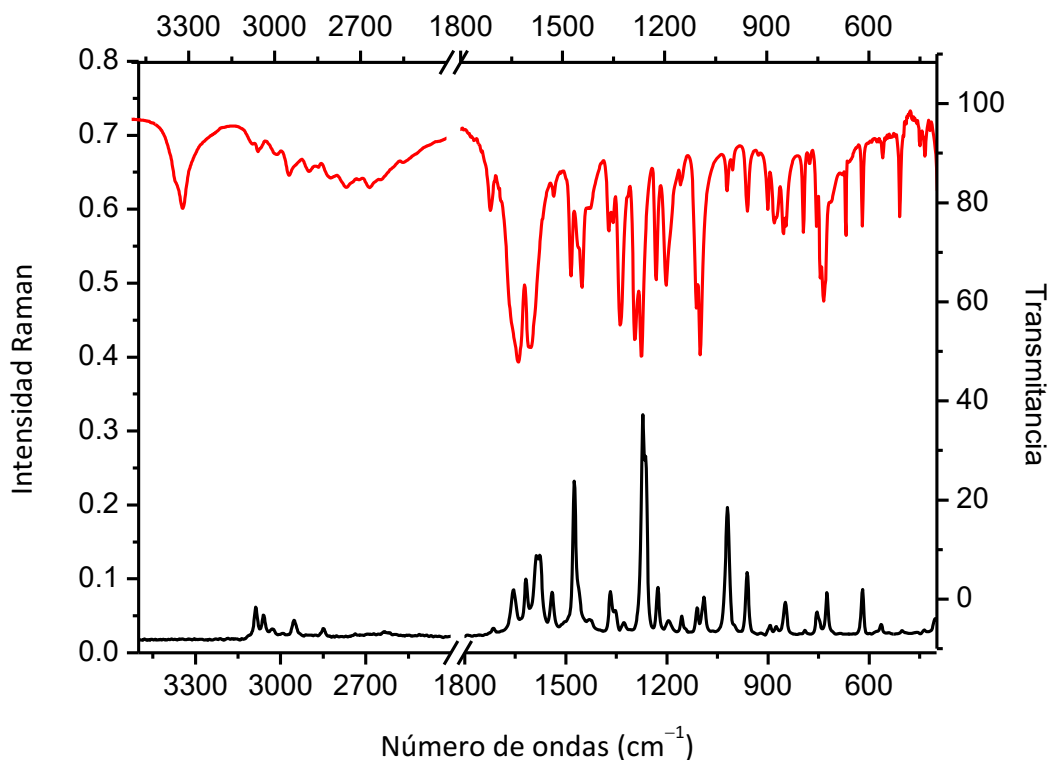


Figura 8.19.: Espectro FTIR de CBZ en pastillas de KBr (Barridos: 64; resolución: 4 cm^{-1}) y FT-Raman de CBZ sólido (Barridos: 32. Longitud de onda del láser: 1064,0 nm. Potencia de salida del láser: 200 mW).

Tabla 8.2.: Asignaciones tentativas de las bandas principales de los espectros FTIR y FT-Raman de CBZ sólido, junto a las asignaciones tentativas de literatura.

Número de ondas (cm^{-1})			Asignaciones tentativas
FTIR	FT-Raman	Raman Reportados previamente	
3058	3059	3064 ^a	ν (C–H)
2950	2953	2955 ^a	ν (C–H)
1713	1715	1714 ^a	ν (C=O)
1525	1539	1538 ^b	δ (NH)/ ν (C–N)
1475	1475	1475 ^a , 1473 ^b , 1473 ^c	δ (CH)/ δ (CN)

1287	1271	1271 ^a , 1268 ^b , 1270 ^c	δ (CH)/ δ (CN)
1267	1264	1262 ^a , 1260 ^c , 1260 ^d	δ (CC)/ δ (NH)
1224	1225	1225 ^b , 1218 ^d	δ (NH)
1016	1021	1020 ^a , 1018 ^c , 1000 ^d , 1018 ^b	δ (CN)/ δ (CC)/ ν (C–O–CH ₃)
956	961	961 ^a , 960 ^c	δ (CH), δ (NCOOCH ₃)
753	754	751 ^b	δ (CH)/ δ (CN)
732	725	724 ^a , 722 ^b , 723 ^c , 728 ^d	δ (CC) / δ (C–O–CH ₃)
619	620	618 ^a , 617 ^b , 617 ^c , 630 ^d	ν_{anillo} ; δ (CC) anillo

ν = estiramiento, δ = deformación, ^a [16]; ^b [17]; ^c [18]; ^d [19]

A pesar de los esfuerzos invertidos, no fue posible obtener señales SERS de CBZ con los sustratos flexibles desarrollados. Este efecto puede ser interpretado en términos de la poca afinidad de la molécula de CBZ sobre la nanoestructura metálica de Ag, ya que esto provocaría que la molécula no se aproxime lo suficiente a la superficie y no se produzca el efecto SERS. Sin embargo, se ha publicado recientemente un gran volumen de trabajos experimentales y cálculos teóricos asociados a la detección del plaguicida mediante espectroscopia Raman y SERS soportado sobre superficies de plata [16,18]. Esto nos llevó a suponer que el CBZ no presenta afinidad por los sustratos que fueron desarrollados en este trabajo. Es importante señalar que la presencia de impurezas no justifica la ausencia de señales SERS, si bien pueden interferir las medidas de los espectros Raman a las concentraciones de trabajo en espectroscopia SERS el efecto de impurezas no se observa en los espectros (no hay fluorescencia).

8.4.3. Características espectrales del TBZ

En la **Figura 8.20.** se observa el espectro Raman y SERS del TBZ medidos con la línea de excitación de 647,1 nm. El espectro Raman del TBZ fue obtenido del sólido de TBZ en un capilar de vidrio sellado, mientras que el espectro SERS de TBZ corresponde a un *sustrato 1* sembrado con $\sim 2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ. Además, en la **Figura 8.21.** se presenta el espectro Raman de una solución saturada de TBZ ($4,0 \times 10^{-2}$ M), junto con el espectro Raman del metanol puro. En la Figura se observa que el espectro de la solución

concentrada del plaguicida se encuentra completamente dominado por las bandas del metanol, que se superponen con las más intensas observadas para TBZ, que se encuentran aproximadamente en las mismas posiciones que el sólido.

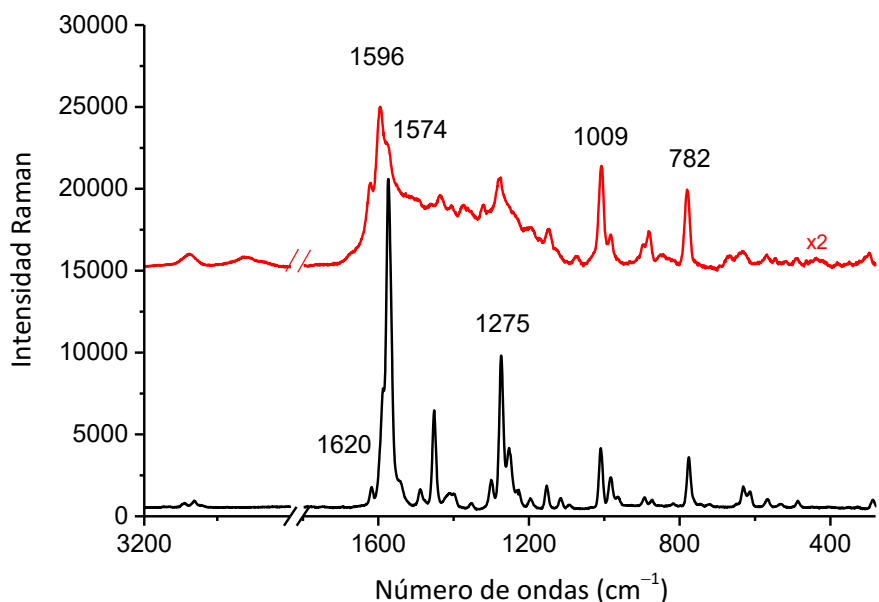


Figura 8.20.: Espectro Raman de TBZ (muestra sólida) (línea negra). (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 200 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 10x (0,25 NA)). Espectro SERS del TBZ sobre el sustrato AgNPs de gel de agar conteniendo ~ 2,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 8 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

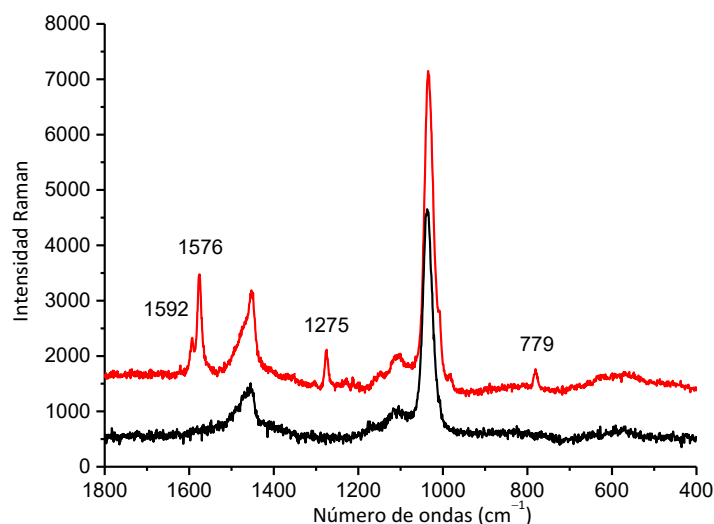


Figura 8.21.: Espectro Raman de una solución concentrada de TBZ en metanol (línea roja) (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 200 mW; tiempo de adquisición: 120 s; 8 acumulaciones; objetivo 10x (0,25 NA)) comparada con el espectro Raman del metanol (línea negra). (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 200 mW; tiempo de adquisición: 20 s; 8 acumulaciones; objetivo 10x (0,25 NA)).

Las bandas más importantes de espectro Raman de TBZ sólido, en solución metanólica y las bandas del espectro SERS se resumen en la **Tabla 8.3.** junto con sus asignaciones tentativas. En la **Figura 8.22.** se presenta la numeración de átomos de la molécula de TBZ empleada para las asignaciones. La estructura de la molécula de TBZ está formada por un grupo bencimidazol y otro tiazol. Asimismo, el resto bencimidazol consiste en anillos de fenilo e imidazol.

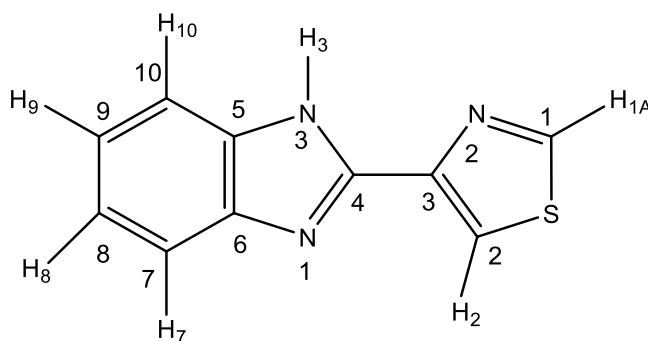


Figura 8.22.: Molécula de TBZ con la numeración de átomos utilizado para las asignaciones en la **Tabla 8.3.**

Tabla 8.3.: Número de ondas (cm^{-1}) del espectro FTIR, Raman normal (muestra sólida), Raman de la solución concentrada ($4,0 \times 10^{-4}$ M) y del espectro SERS del TBZ.

Número de ondas (cm^{-1})								Asignaciones tentativas
FTIR	FTIR Reportados [7]	Raman sólido	Raman Reportados [1 ^a ,7 ^b]	TBZ en solución	B3LYP-D2/6-31G /d,p [7]	SERS	SERS Reportado [1]	
1622	1622	1620	1624 ^a ;1623 ^b	1592	1629	1622	1624	v (C=C) Ph
1591	1592	1588	1580 ^a ; 1593 ^b		1593	1596	1580	v (C=C) Ph
1579	1579	1575	1579 ^b	1576	1574	1574		v(C3-C4)
1491	1492	1489	1494 ^b		1501			v(C3-C2)
1480	1481							v (C4-N1)
1457	1455	1453	1456 ^a ; 1456 ^b		1461			v (C2=N) Thi
1413	1412	1414	1416 ^b		1419	1436		v (C4-N3) Imi
1401	1403	1397	1357 ^b		1369	1393		v (C-C) Ph
1357	1358	1355	1357 ^b		1369	1349		v (C3-N2) Thi
1305	1306	1302	1306 ^a ; 1303 ^b		1309 y 1317	1334		v (C5-N3)
1277	1278	1275	1276 ^a ; 1278 ^b		1278	1275	1275	v(C5-N3)
1254	1254	1255	1256 ^a ; 1257 ^b		1273			δ (N-H)
1231	1231	1233	1231 ^b		1227			v (C6-N1)
1196	1197	1198	1199 ^a ; 1201 ^b		1207	1198	1198	δ (C2-H); δ (C1-H)
1158	1158	1155	1157 ^b		1157	-		δ (CH) Ph
		1119	1120 ^b		1119	-		δ (CH) Ph
1012	1013	1010	1014 ^b ,1011 ^c		1017	1009	1009	v (C-C) Ph
986	986	984	989 ^b		983			δ (NCN) Imi
927	927	965	970 ^b		967			γ (CH) Ph
903	902	896	900 y 900 ^b		893 y 885	900		δ (C3N2C1) / δ (CC) Ph
875	874	875	879 ^b		867	884		ν_{simet} (C1SC2)
770	780	778	782 ^a ; 782 ^b	779	783	782	782	ν_{anti} (C1SC2)

^a ν = estiramiento, δ = deformación en el plano, Ph = vibraciones del grupo fenilo, Thi = vibraciones del anillo tiazol, Imi = vibraciones asociadas al grupo imidazol. ^b Número de ondas reportadas para TBZ; B3LYP-D2/6-31G/ (d,p) y experimentales previamente reportados [7]; ^c asignación propuesta de los espectros Raman y SERS experimentales [1].

El espectro Raman del TBZ junto con las asignaciones ha sido reportado previamente por varios autores como resultado de trabajos experimentales y teóricos [1,7,20,21]. La asignación tentativa de la **Tabla 8.3.** se realizó no solo comparando las reportadas en la literatura sino también utilizando el espectro calculado obtenido por la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) (B3LYP/6-31+ G(d)). Los cambios más significativos en el espectro SERS en comparación con el espectro Raman de TBZ sólido son; por un lado, el aumento de las bandas correspondientes a los modos de estiramiento CH (banda ancha a $\sim 3075\text{ cm}^{-1}$), el aumento relativo en la banda a $\sim 884\text{ cm}^{-1}$ que se puede atribuir al modo de estiramiento simétrico CSC del resto tiazol y las bandas a 782 y 1009 cm^{-1} asignadas al ν_{anti} (CSC) y ν (C–C) del grupo fenilo, respectivamente. Por otro lado, la región espectral entre 1574 y 1276 cm^{-1} presenta modos de vibraciones que involucran estiramientos de CN muestra una superposición de bandas fluctuantes que varían con la concentración de TBZ y de spot a spot. Los cambios en la intensidad de las señales pueden estar relacionados con la orientación de la molécula de TBZ sobre la superficie metálica [1]. Teniendo en cuenta la estructura molecular de TBZ, las moléculas podrían adsorberse a través del par de electrones libres de los átomos de N o S (o ambos), lo que daría como resultado una orientación vertical hacia la superficie de las NP de Ag, o a través de los electrones π del anillo, lo que daría como resultado una orientación plana de la molécula en la superficie (**Figura 8.23.**) [1,20,21]. El hecho de que los modos vibracionales más intensificados mostrados recientemente correspondan a estiramientos junto con la fuerte presencia de las señales asignadas al resto tiazol de la molécula de TBZ en el espectro SERS concuerda con una posible interacción a través del anillo tiazol dado lugar a una orientación más perpendicular a la superficie metálica. Olivera, M. J. S. y col. [1] propusieron basándose en cálculos DFT de reactividad local que la interacción más probable de la molécula de TBZ sobre una superficie de AgNPs tendría lugar a través del átomo de S como se observa en la **Figura 8.23.b.**

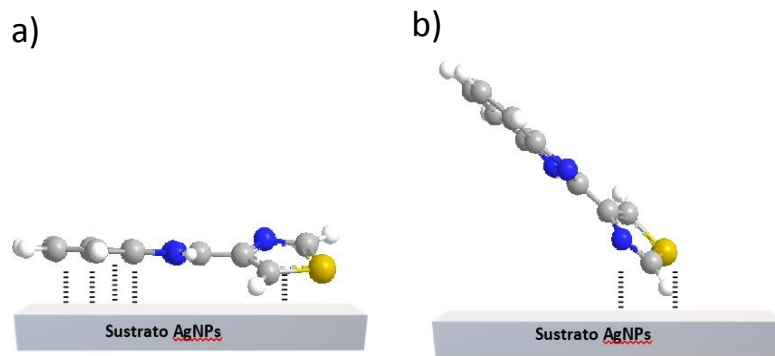


Figura 8.23.: Posibles orientaciones de la adsorción de la molécula de TBZ sobre la superficie de Ag a) orientación plana de la molécula TBZ sobre sustrato de AgNPs y b) orientación oblicua de la molécula MB sobre sustrato de AgNPs. Esquemas tomados de bibliografía [1,21].

Como se mencionó al comienzo del capítulo, los espectros SERS obtenidos de TBZ cambian no solo con la concentración superficial de TBZ sino también al cambiar de un spot a otro, fundamentalmente en la región de $1700\text{-}1275\text{ cm}^{-1}$. En la **Figura 8.24.** se presentan los espectros SERS de TBZ medidos con los *sustratos 1* deshidratados y contaminados con $4,0$ y $0,40\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ, donde se recolectaron 10 spots diferentes para cada una de las concentraciones. En los mismos se observaron cambios en los espectros mayoritariamente en la región espectral antes mencionada. Estas variaciones podrían estar relacionadas con diferentes orientaciones de la molécula de TBZ sobre la superficie metálica [22,23] provocado por la diferencia de concentración superficial de TBZ. Además, el efecto del láser sobre la muestra, por el calentamiento local, por ejemplo, puede afectar la orientación de las moléculas adsorbidas provocando las fluctuaciones observadas en los espectros SERS medidos.

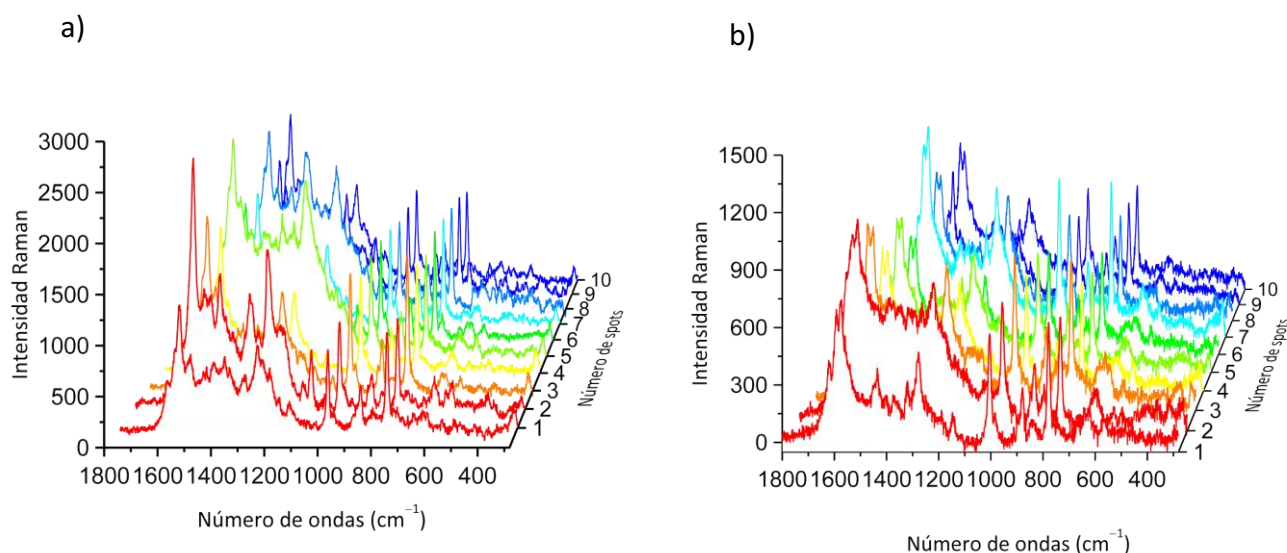


Figura 8.24.: a) Espectros SERS de TBZ contaminados con $4,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ tomados en 10 spots aleatorios del mismo sustrato SERS de gel de agar. b) Espectros SERS de TBZ contaminados con $0,40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ tomados en 10 spots aleatorios del sustrato de gel de agar.

8.4.4. Detección de residuos de plaguicidas en cáscaras de frutas y vegetales

Sustrato 1: Gel agar-AgNPs

Para la detección *in situ* de residuos de TBZ en las superficies de las cáscaras de frutas y verduras seleccionadas (manzana, frutilla, morrón verde, berenjena, pera y tomate), se procedió como se mencionó en el capítulo 7. Se cortaron las cáscaras de 1 cm^2 previamente lavadas y se contaminó intencionalmente la superficie de cada una de ellas con $20,0$ o $25,0 \mu\text{L}$ de soluciones metánolicas de TBZ de diferentes concentraciones alcanzándose concentraciones superficiales desde $5,0 \times 10^4$ hasta $4,0 \text{ ng}/\text{cm}$. Luego de unos minutos de evaporado el solvente, se realizó el proceso de micro-extracción sobre cada una de las cáscaras de frutas y vegetales contaminadas. Para ello, se colocaron primero $20,0$ o $25,0 \mu\text{L}$ de metanol sobre las superficies de las frutas y vegetales previamente sembradas, es decir el mismo volumen empleado en la contaminación, para disolver el fungicida que fue absorbido o que penetró en la cáscara. En un segundo paso se frotó cada superficie de cáscara de las frutas y vegetales con el *sustrato 1* de 1 cm^2 durante aproximadamente 15 s . Finalmente, los sustratos SERS se colocaron en

portaobjetos de microscopio y se dejaron deshidratar a temperatura ambiente durante 24 h antes de las medidas SERS. Adicionalmente, se prepararon controles de cada una de las frutas y verduras seleccionadas. Para ello, se colocaron 20,0 o 25,0 μL de metanol sobre cada una de las superficies de las frutas y vegetales previamente lavadas con agua de la canilla y enjuagadas con agua milli-Q. Después de secado el solvente, se colocó nuevamente el mismo volumen de solvente empleado en el paso anterior y se frotaron las cáscaras empleando el gel de agar con las AgNPs. Los geles de los controles (blancos) de las cáscaras de frutas y vegetales también se dejaron secar durante aproximadamente 24 h hasta su total deshidratación sobre portaobjetos para poder llevar a cabo las medidas SERS. En la **Figura 8.25.** se muestran algunas de las frutas y verduras seleccionadas lavadas y cortadas de 1 cm^2 para el proceso de contaminación, microextracción y detección de TBZ.

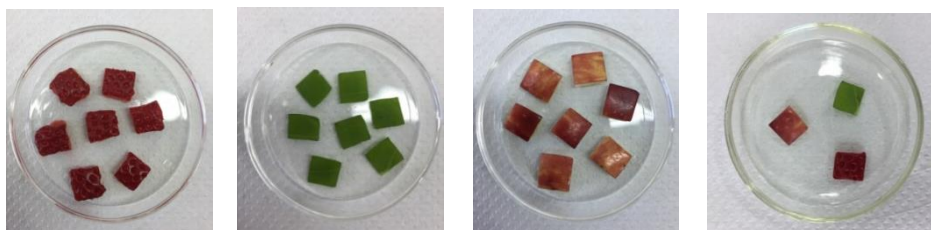


Figura 8.25.: Cáscaras de frutas y vegetales (frutilla, morrón verde y manzana) cortadas de 1 cm^2 .

Los espectros SERS para la mayoría de las cáscaras de frutas y vegetales controles no mostraron señales significativas, lo que demuestra que las posibles moléculas presentes en las superficies lavadas de las cáscaras no interferirán en la detección de TBZ. Una de las excepciones observadas fue para el control de la cáscara de morrón que mostro señales que podrían estar asociadas a la presencia de TBZ en bajas concentraciones (**Figura 8.26.**).

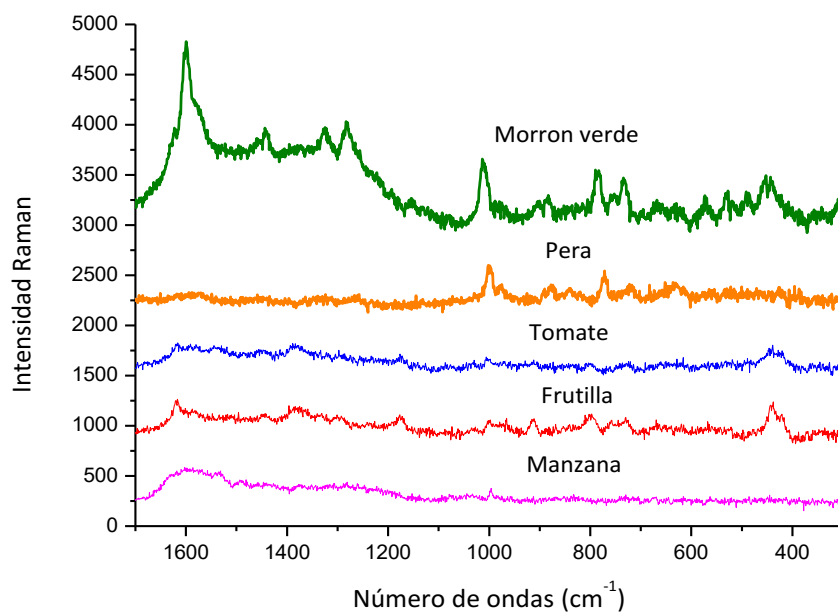


Figura 8.26.: Espectros SERS de los blancos o controles de las cáscaras de frutas y vegetales lavadas luego del proceso de microextracción con el *sustrato 1*. Las líneas de base de los espectros seleccionados fueron corregidos. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

Es importante destacar que dos de las tres peras seleccionadas para estudiar el fungicida en este trabajo de Tesis presentaron en su control señales; una de ellas presentó un espectro consistente con el TBZ, mientras que la otra presentó señales muy intensas que no pudieron asignarse a ninguna sustancia. En la **Figura 8.27.** se muestran los espectros SERS de los blancos de las cáscaras de peras. Cada espectro corresponde a una pera diferente, comprada en verdulerías diferentes. Es importante destacar que para realizar los ensayos que permitieron determinar hasta qué concentraciones superficiales es posible detectar TBZ con el método propuesto se emplearon cáscaras cuyos espectros blancos estaban libres de señales.

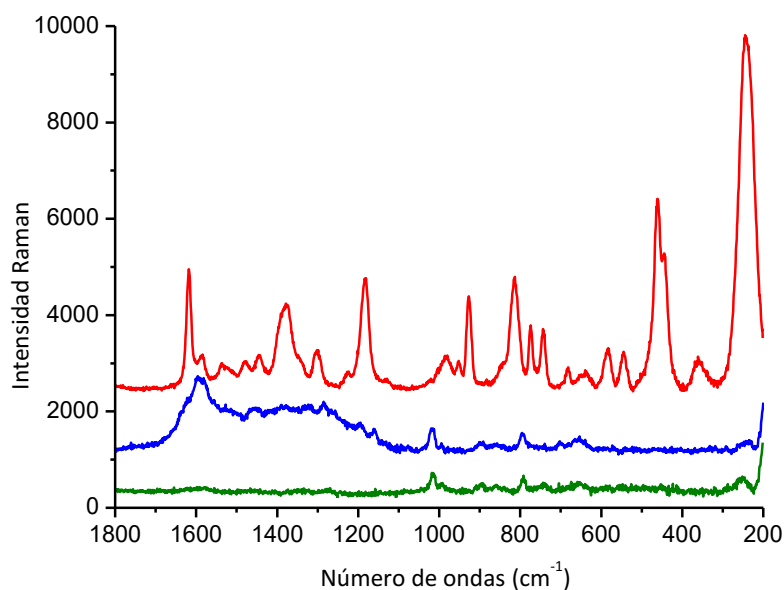


Figura 8.27.: Espectros SERS de los blancos de las cáscaras de peras. Cada espectro corresponde a una pera diferente comprada en verdulerías diferentes. Las superficies se trataron con el mismo volumen de metanol empleado en el proceso de contaminación. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75NA)).

En la **Figura 8.28.** y **Figura 8.29.** se observan los espectros SERS de TBZ extraído de las cáscaras de frutas y vegetales (berenjena, morrón verde, tomate, frutilla, manzana y pera) empleando el *sustrato 1*. Como se observa en la primera figura, para la berenjena y el morrón verde el límite de detección más bajo de TBZ fue de 50 ng/cm², mientras que para la cáscara de tomate la concentración superficial más baja que se pudo detectar fue de 0,50 µg/cm². Como se puede observar en la **Figura 8.29.** para la frutilla el valor más bajo detectado en este trabajo fue de 0,50 µg/cm², mientras que para las cáscaras de manzana y pera fueron de 0,20 µg/cm² y 40 ng/cm², respectivamente.

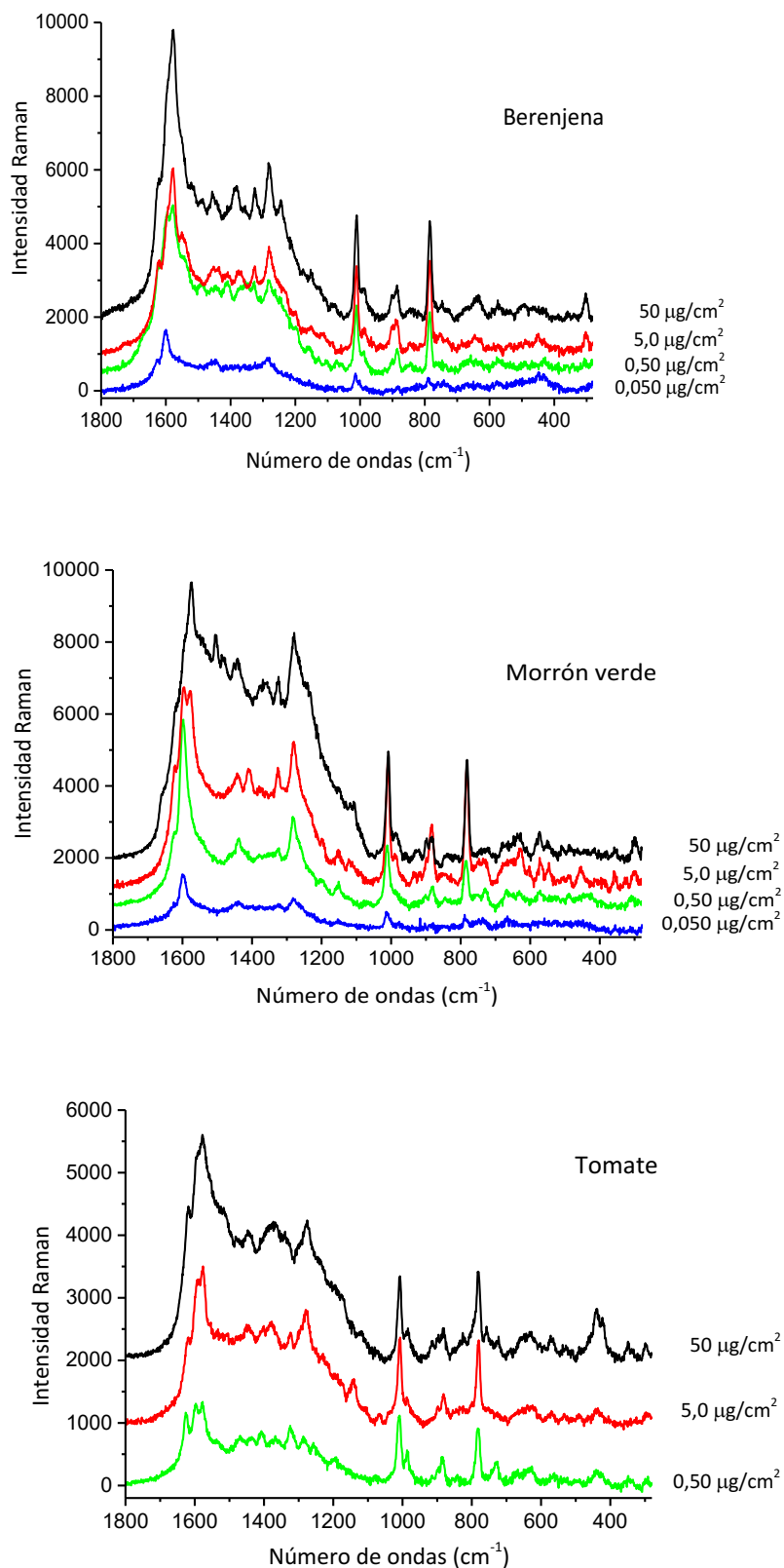


Figura 8.28.: Espectros SERS del TBZ extraído de a) Cáscara de berenjena; b) Cáscara de Morrón verde; c) Cáscara de tomate. Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA).

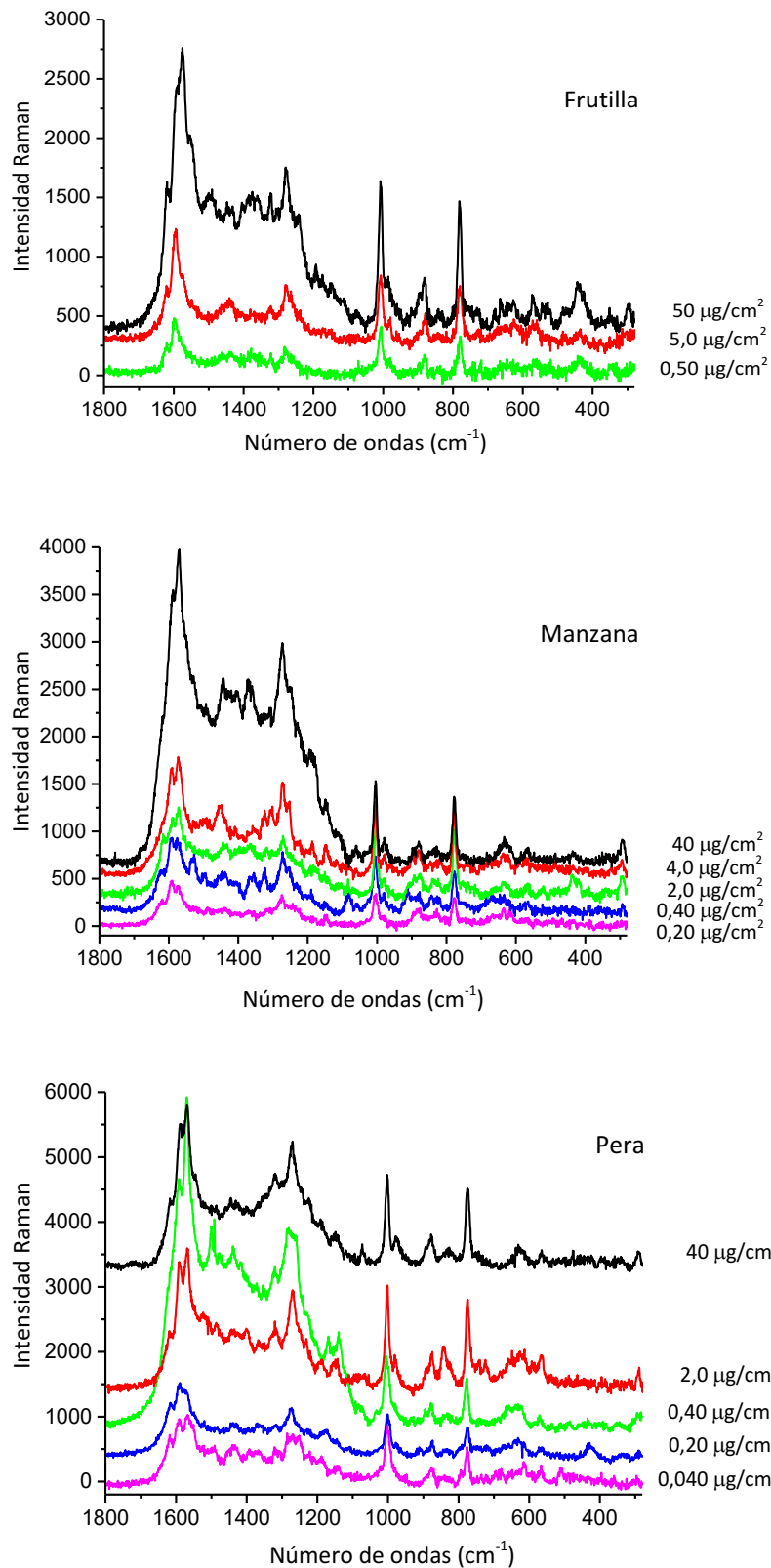


Figura 8.29.: Espectros SERS del TBZ extraído de a) Cáscara de frutilla; b) Cáscara de manzana; c) Cáscara de pera. Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA).

Durante este trabajo, se evaluó además la capacidad de recuperación de TBZ, mediante el proceso de microextracción, de las distintas frutas y vegetales. Para determinar el porcentaje de recuperación de TBZ sobre cada una de las cáscaras de frutas y vegetales empleando *el sustrato 1* se utilizó la curva de calibración en la zona lineal correspondiente al día de la medida de la fruta o verdura y únicamente se estimó la recuperación para valores de áreas obtenidos dentro de ese rango lineal, ya que para concentraciones superficiales elevadas los valores de área obtenidos caen dentro de la zona de saturación del sustrato. Las recuperaciones del fungicida se estimaron comparando la concentración superficial sembrada intencionalmente sobre las cáscaras con los valores obtenidos después de medir el área de la banda de 782 cm^{-1} e ingresando con este valor en la curva de calibración. Los porcentajes de recuperaciones más altos estimados se obtuvieron para el morrón verde y berenjena, aproximadamente el 100 % del fungicida se recuperó de las cáscaras durante la primera extracción, mientras que, para las cáscaras de pera, tomate y manzana, las recuperaciones estimadas resultantes fueron comparables, siendo $\sim 60\text{-}50\%$ para todas ellas. El valor de recuperación más bajo se obtuvo para la frutilla ya que solo se pudo recuperar $\sim 12\%$ del TBZ adicionado a la superficie mediante el método propuesto. Las variaciones observadas en el grado de recuperación de TBZ sobre las distintas superficies de las frutas y vegetales se atribuyen a las diferencias en las propiedades superficiales que tienen las mismas, ya que afecta el grado de penetración del fungicida hacia el interior de la fruta o vegetal. Estas diferencias son las responsables de los diferentes límites de detección de TBZ en las diferentes cáscaras de frutas y verduras. Además, se examinó el grado de recuperación luego de sucesivas microextracciones con *el sustrato 1* sobre una cáscara de manzana de un 1 cm^2 contaminada con $0,40\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ. Para ello se realizaron varias microextracciones hasta no observar señal SERS del TBZ. En la **Figura 7.30.** se muestran espectros SERS de TBZ obtenidos luego de las extracciones sucesivas realizadas sobre la superficie de una cáscara de manzana que fue contaminada inicialmente con $0,40\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TBZ. Después de la primera extracción, el porcentaje de TBZ recuperado de la cáscara fue $\sim 60\%$, dejando una concentración superficial de $\sim 0,16\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Luego de una segunda microextracción sobre la misma cáscara de manzana el analito recuperado fue de $\sim 70\%$, lo que deja una concentración superficial de $\sim 0,050\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Finalmente, en una tercera

microextracción no se observó señal de SERS, lo que está de acuerdo con el límite alcanzado para la cáscara de manzana de $0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

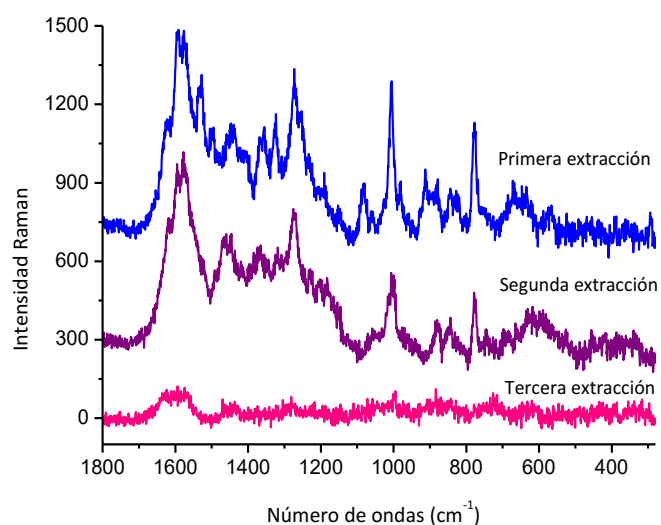


Figura 8.30.: Espectros SERS de TBZ luego de varias extracciones realizadas sobre una misma cáscara de manzana contaminada inicialmente con $20,0 \mu\text{L}$ de una solución $1,00 \times 10^{-4} \text{ M}$ de TBZ. Longitud de onda de excitación: $647,1 \text{ nm}$; potencia de salida del láser: 100 mW ; tiempo de adquisición: 10 s ; 4 acumulaciones; objetivo $50\times$ ($0,75 \text{ NA}$).

Finalmente, para comparar la mínima concentración detectada en este trabajo de Tesis para la cáscara de manzana con los LMR establecido por los sistemas de regulaciones para el TBZ, se calculó la concentración mínima detectada de TBZ en ppm. Para ello, se hicieron algunas consideraciones. Por un lado, se consideró una manzana de forma esférica y se midió el diámetro, lo que arrojó un valor de $\sim 8 \text{ cm}$, comparable con el tamaño promedio de las manzanas [24] y, además, se consideró que el plaguicida está presente únicamente en la cáscara de la misma. Con estas consideraciones se determinó que la cantidad total de TBZ que se pudo detectar fue de $\sim 40 \mu\text{g}$ ($0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 200 \text{ cm}^2$) (superficie aproximada de la manzana calculada como $4 \pi r^2$). Por otro lado, considerando el peso de la manzana de alrededor de 220 g , la concentración mínima estimada (en ppm) detectada por el método desarrollado fue de $\sim 0,20 \text{ ppm}$ por manzana. Esto permitió comparar la concentración superficial mínima detectada con los valores de LMR establecidos por las agencias gubernamentales, siendo los LMR establecidos un orden de magnitud superior al detectado con esta metodología.

Sustrato 2: Papel de filtro-AgNSs

Para la detección de residuos del fungicida en las cáscaras de frutas seleccionadas (manzana y pera), se cortaron cáscaras de 1 cm² previamente lavadas y se contaminaron intencionalmente las superficies con 10,0 µL de soluciones de TBZ de diferentes concentraciones. Luego de que las soluciones se secan de la superficie de las frutas se llevó a cabo el proceso de microextracción. Para ello, se colocó sobre las superficies de los frutos 10,0 µL de metanol y se frotó la superficie de las cáscaras con el sustrato de papel de filtro de celulosa impregnado de AgNSs de 1 cm² durante 15 s. Posteriormente, los sustratos se colocaron en portaobjetos de microscopio dejándolos secar aproximadamente 1 h. Además, se prepararon sustratos sin analito como control o blanco de las cáscaras de manzana y pera. Para ello, se frotaron las cáscaras con el sustrato durante 15 s luego de adicionar 10,0 µL de metanol (**Figura 8.30.**).

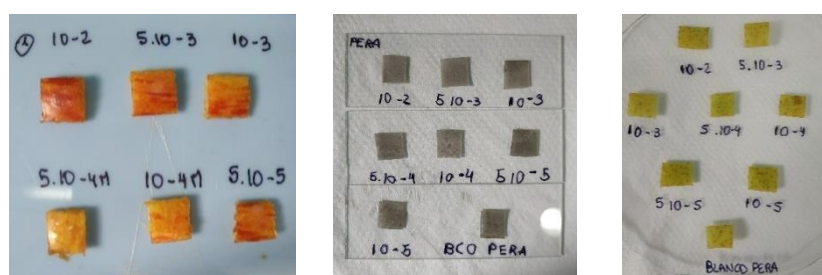


Figura 8.30.: Cáscaras de frutas (manzana y pera) y sustratos SERS flexible empleado para la microextracción .

Los espectros SERS de los de controles de las cáscaras de frutas no mostraron señales que pudieran interferir en el proceso de detección del plaguicida, asegurando de esta manera que las bandas observadas en los espectros SERS corresponden al analito en estudio. En la **Figura 8.31.** y **Figura 8.32.** se muestran los espectros SERS representativos de la extracción de las cáscaras de manzana y pera de los 5-10 spots colectados para cada concentración. Las mínimas concentraciones detectadas luego de la extracción sobre las cáscaras de manzana y pera fueron de 1,0 y 0,20 µg/cm², respectivamente.

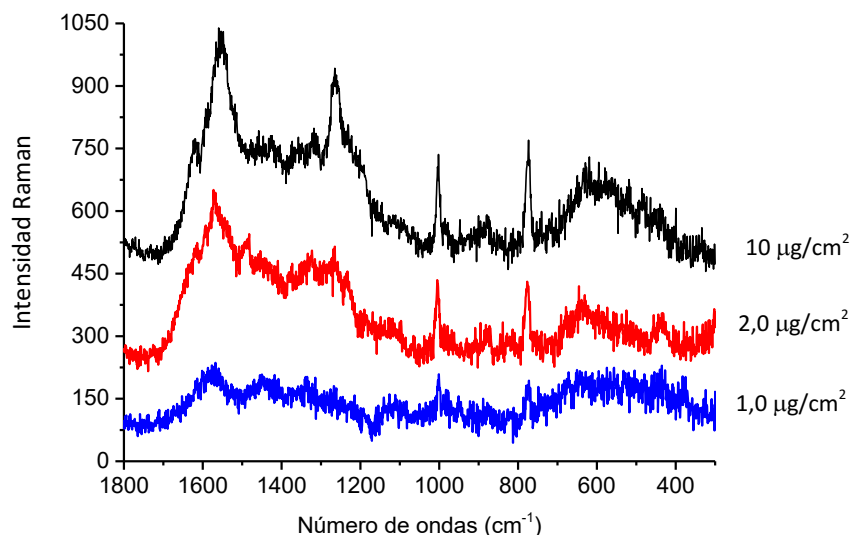


Figura 8.31.: Espectros representativos extraído de las cáscaras de manzanas previamente contaminadas con 10,0 μL de diferentes concentraciones de TBZ. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

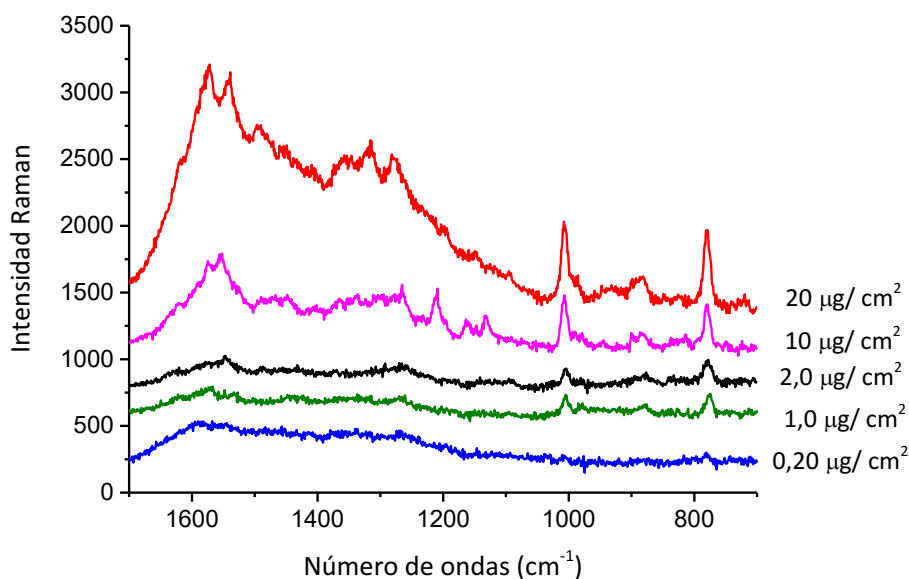


Figura 8.32.: Espectros representativos extraído de las cáscaras de pera previamente contaminadas con 10,0 μL de diferentes concentraciones de TBZ. (Longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 50x (0,75 NA)).

8.5. Conclusiones

Inicialmente, se caracterizaron los plaguicidas TBZ y CBZ mediante el análisis de los espectros de absorción UV-Visible y FTIR. Estas técnicas permitieron la identificación de ambos fungicidas basados en literatura previamente reportada. Además, mediante esta técnica se descartó la posibilidad de observar efectos Raman resonantes o prerresonantes con las líneas de excitación visibles disponibles.

El sustrato SERS flexible basado en AgNPs inmovilizada en gel de agar (*sustrato 1*) resultó eficiente para la determinación de TBZ mostrando uniformidad y reproducibilidad. En cuanto a la evaluación del segundo sustrato, AgNSs soportado sobre papel de filtro (*sustrato 2*), los resultados fueron inferiores que a los del gel. Las pruebas realizadas para determinar si las señales SERS del TBZ sobre el *sustrato 1* se modificaban al realizar las medidas del lado donde se contaminó el gel de agar o del lado opuesto permitió determinar que las intensificaciones no dependen del lado del sustrato que se mida, ya que, una vez atrapado el analito en la matriz de agar el espectro puede recogerse de la superficie que estuvo en contacto con la muestra o del otro lado, indistintamente.

Los límites de detección más bajos alcanzados de TBZ extraído de las frutas y vegetales empleando el *sustrato 1* para el morrón y berenjena fueron de 50 ng/cm². La concentración más baja que fue posible detectar de TBZ en cáscaras de tomate y frutilla fue de 0,50 µg/cm² y para manzana y pera de 0,20 µg/cm² y 40 ng/cm², respectivamente. Con el empleo del *sustrato 2* empleado para extraer el fungicida, la concentración más baja detectada para cáscara de manzana y pera fue de 1,0 y 0,20 µg/cm² respectivamente. En la **Tabla 8.5.** se muestra una comparación de los LD alcanzados con diferentes sustratos SERS flexibles empleados para la extracción de TBZ sobre diferentes frutas y vegetales reportados en la literatura. Como se puede observar, los métodos descritos en este trabajo para TBZ muestran LD comparables en las cáscaras de frutas y vegetales cuando se comparan los límites obtenidos con los reportados previamente.

Tabla 8.5.: Comparación de los límites de detección de diferentes sustratos SERS desarrollados reportados para la extracción de TBZ sobre cáscaras de frutas y vegetales.

* Concentración superficial detectada.

Sustrato SERS	Matriz estudiada	LD	Referencia
Sustrato de cinta adhesiva con Ag nanovarillas	Superficie de espinacas	10^{-6} M	[25]
Sustrato de matriz de nanovarillas de Au	Superficie de manzana	0,06 ppm	[26]
Nanopartículas de Au/Ag sembradas sobre acetato de celulosa	Superficie de manzana	15,1 ng/cm ²	[27]
Micela de poliuretano/coloide Ag	cáscara de frutas y vegetales	20 ng/mL	[28]
Coloide de Au	Manzana	0,1 µg/g	[29]
Dendritas de Ag en hisopo	Superficie de manzana	0,1 µg/g	[30]
Nanofibras de celulosa recubiertas con AgNPs	Manzana	5 ppm	[31]
AgNPs en hidrogel	Cáscara de naranja	2,5 ng/cm ²	[32]
AgNPs gel	Cáscara de manzana	0,20 µg/cm ²	<i>Esta tesis. Sustrato 1</i>
AgNPs gel	Cáscara de pera	40 ng/cm ²	<i>Esta tesis. Sustrato 1</i>
AgNPs gel	Cáscara de tomate y frutilla	50 ng/cm ²	<i>Esta tesis. Sustrato 1</i>
AgNPs gel	Cáscara de berenjena y morrón	0,50 µg/cm ²	<i>Esta tesis. Sustrato 1</i>
AgNSs papel*	Cáscara de manzana	1,0 µg/cm ²	<i>Esta tesis. Sustrato 2</i>
AgNSs papel*	Cáscara de pera	0,20 µg/cm ²	<i>Esta tesis. Sustrato 2</i>

8.6. Referencias

- [1] Oliveira, M. J. S; Rubira, R. J. G.; Furini, L. N.; Batagin-Neto, A. y Constantino, C. J. L. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, 517, 145786.
- [2] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-934-2010-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>. Consultado en abril del 2022.
- [3] Environmental Protection Agency. <https://www.epa.gov/pesticide-tolerances/pesticide-types-index>. Consultado en abril del 2022.
- [4] European Commission. https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/maximum-residue-levels_en. Consultado en abril del 2022.
- [5] O’Neil, M. J. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 14th ed.; Merck: Whitehouse Station, NJ, USA, **2006**; 322–323.
- [6] Rajzman, A. *Analyst*. **1974**, 99, 1200-127.
- [7] Tabanez, A. M.; Nogueira, B. A.; Milani, A.; Eusébio, M. E. S.; Paixão, J. A.; Nur Kabuk, H.; Jajuga, M.; Ildiz, G. O. y Fausto, R. *Molecules*. **2020**; 25.3083.
- [8] Meszlenyi, G.; Kortvelyessy, J.; Juhasz, E. y Lelkes, M. *Analyst*. **1990**, 115, 1491–1493.
- [9] Mohamed, A.; Janaki, P.; Arulmozhiselvan, K. y Roseleen, S.S. J. *Int. J. Curr. Microbiol. App.Sci.* **2021**. 10(01): 1273–1282.
- [10] Furini, L. N.; Constantino, C. J. L.; Sanchez-Cortes, S.; Otero, J. C. y López-Tocón, I. J. *Colloid Interface Sci.* **2016**, 465, 183–189.
- [11] De Oliveira, K. V.; Rubim, J. C. *Vib. Spectrosc.* **2016**, 86, 290–301.
- [12] Hussain, N.; Pu, H.; Sun, D. W. *Food Chem.* **2021**, 350, 129025, 1–11.
- [13] Aldeanueva-Potel, P.; Faucher, E.; Alvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán, L. M.; Brust, M. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 9233-9238.
- [14] Picone, A. L.; Rizzato, M. L.; Lusi, A. R.; Romano, R. M. *Food Chem.* **2022**, 373, 131570, 1–8.
- [15] Picone, A. L.; Della Védova, C. O.; Romano, R. M. *Vib.Spectrosc.* **2020**, 373, 131579, 1–8.
- [16] Furini, L. N.; Constantino, C. J. L.; Sanchez-Cortes,S.; Otero, J. C. y López-Tocón, I.; J. *Colloid. Interface Sci.* **2016**. 465. 183–189.

-
- [17] Huang, X.; Zhang, N.; Li, Z.; Shi, J.; Tahir, H. E.; Sun, Y.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Holmes, M. y Zou, X. *Foods*. **2022**, *11*, 1287, 1–12.
- [18] Furini, L. N.; Sanchez-Cortes, S.; López-Tocón, I. Otero, J. C.; Ricardo F. Aroca, R. F. y Constantino, C. J. L. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, *46*, 1095–1101.
- [19] Yang, Q.; Lin, H.; Ma, J.; Chen, N.; Zhao, C.; Guo, D.; Niu, B.; Zhao, Z.; Deng, X. y Chen, Q. *Molecules*. **2022**, *27*, 4230.
- [20] Müller, C.; David, L.; Chis, V.; Pînzaru, S. C. *Food Chem.* **2014**, *145*, 814–820.
- [21] Kim, M.S.; Kim, M. K.; Lee, C. J.; Jung, Y. M. y Lee, M. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, *30*, 12, 2930–2934.
- [22] Fortuni, B.; Fujita, Y.; Ricci, M.; Inose, T. Aubert, R.; Lu, G.; Hutchison, J. A.; Hofkens, J.; Latterini, L. y Uji-i, H. *Chem. Comm.* **2017**, *53*, 5121–5124.
- [23] Luo, H.; Huang, Y.; Lai, K.; Rasco, B. A.; Fan, Y. *Food Control*. **2016**, *68*, 229–235.
- [24] The Size of Stemilt Apples.
<http://www.stemilt.com/assets/pdfs/AppleSizing.pdf>. Consultado en noviembre del 2022.
- [25] Jiang, J.; Zou, S.; Li, Y.; Zhao, F.; Chen, J.; Wang, S.; Wu, H.; Xu, J.; Chu, M.; Liao, J. y Zhang, Z. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 603, 1–8.
- [26] Fu, G.; Sun, D-W.; Pu, H. y Wei, Q. *Talanta* **2019**, *195*, 841–849.
- [27] Zong, C.; Ge, M.; Pan, H.; Wang, J.; Nie, X.; Zhang, Q.; Zhao, W.; Liu, X. y Yu, Y. *RSC Adv.*, **2019**, *9*, 2857–2864.
- [28] Kang, Y.; Li, L.; Chen, W.; Zhang, F.; Du, Y. y Wu, T. *Food Anal. Methods* **2018**, *11*, 161–3169.
- [29] Luo, H.; Huang, Y.; Lai, K.; Rasco, B. A. y Fan, Y. *Food Control* **2016**, *68*, 229–235.
- [30] He, L.; Chen, T. y Labuza, T. P. *Food Chemistry* **2014**, *148*, 42–46.
- [31] Liou, P.; Nayigiziki, F. X.; Kong, F.; Mustapha, A. y Lin, M. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *157*, 643–650.
- [32] Chen, M.; Zhang, J.; Zhu, X.; Liu, Z.; Huang, J.; Jiang, X.; Fu, F.; Lin, Z. y Dong, Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 26216–26224.

CAPÍTULO 9
CONCLUSIONES
GENERALES

9.1. Conclusiones generales

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha desarrollado con el objetivo general de desarrollar y caracterizar nuevos sustratos SERS para ser empleados en la detección de contaminantes, fundamentalmente plaguicidas. Una vez desarrollados los sustratos capaces de determinar las sustancias de interés, se planteó como objetivo desarrollar metodologías que permitan el empleo de dichos sustratos para la detección *in situ* de la presencia de estos plaguicidas seleccionados en cáscaras de frutas y vegetales (manzana, pera, frutilla, tomate, morrón verde, berenjena, cereza). Inicialmente, se sintetizaron dos tipos de nanopartículas de plata de diferentes morfologías (AgNPs: nanopartículas “esféricas” de Ag y AgNSs: nanoestrellas de Ag) y se caracterizaron mediante espectroscopia UV-Vis y microscopías electrónicas (STEM y SEM), lo que permitió determinar la longitud de onda correspondiente a la resonancia de los plasmones superficiales, así como también, las distribuciones de forma y tamaño de las nanopartículas sintetizadas. Además, las dispersiones de NPs preparadas fueron evaluadas para determinar su estabilidad en el tiempo mediante su seguimiento por espectroscopia UV-Vis, mostrando que las dispersiones de AgNPs “esféricas” resultaron estables por al menos un año. Las NPs sintetizadas se emplearon en el desarrollo de dos sustratos SERS flexibles; por un lado, el *sustrato 1* a base de AgNPs soportadas en un gel de agar y por el otro, un sustrato formado por papel de filtro de celulosa impregnado con AgNSs, *sustrato 2*. Ambos sustratos presentan bajos costos, son de fácil fabricación y permiten la realización de determinaciones directas e *in situ* de los analitos de interés sobre las superficies planteadas, en el caso de esta Tesis cáscaras de frutas y vegetales. Las plataformas fabricadas fueron caracterizadas por espectroscopia UV-Visible DRS y evaluadas inicialmente frente a la molécula de prueba azul de metileno (MB), para luego evaluar su actividad frente a los plaguicidas seleccionados y ser aplicadas en la detección de los mismos sobre las superficies de cáscaras de frutas y vegetales. El *sustrato 1* resultó ser el más sensible llegando a detectar concentraciones superficiales de $\sim 3 \text{ pg.cm}^{-2}$ para el MB lo que corresponde a aproximadamente 60 moléculas/*spot*, considerando que el tamaño del *spot* láser es de aproximadamente $1 \text{ }\mu\text{m}^2$. El *sustrato 2* no pudo ser evaluado frente al MB ya que se

observó mucha fluorescencia en las medidas Raman. Por dicho motivo, se determinó su eficiencia directamente empleando los plaguicidas seleccionados.

Los plaguicidas estudiados fueron: tiram, tiabendazol y carbendazim. Todos fueron evaluados con ambos sustratos, determinando las mejores condiciones experimentales y los LD alcanzados para cada sustancia con cada sustrato. El *sustrato 1* presentó gran uniformidad frente a las especies estudiadas. Las señales SERS provenientes del analito se incrementan a medida que el sustrato se deshidrata, ya que durante el proceso de deshidratación el gel de agar encapsula al analito mientras se acercan las AgNPs, incrementando el número de *hot spots* y por ende la respuesta SERS de la molécula en estudio. Los sustratos deshidratados conteniendo los diferentes analitos analizados mostraron señales SERS luego de varios meses de preparados, demostrando la capacidad que presenta el gel de agar de encapsular y conservar tanto a las moléculas de analito como a las partículas metálicas.

Finalmente, se emplearon los sustratos SERS flexibles para detectar residuos de plaguicidas (tiram, tiabendazol y carbendazim) en cáscaras de diferentes frutas y vegetales mediante el desarrollo de diferentes metodologías *in situ* para extraer los plaguicidas de las cáscaras, para posteriormente realizar las determinaciones. Las plataformas SERS flexibles desarrolladas y empleadas como “sello” permitieron extraer y detectar trazas de los agroquímicos ensayados en cáscaras de frutas y vegetales por debajo de los límites establecidos por los entes de regulación nacional e internacionales. En este trabajo se ha llegado a detectar concentraciones superficiales, por ejemplo para la cáscara de manzana de $0,006 \text{ ng/cm}^2$ de tiram con el *sustrato 1* y $0,024 \text{ pg/cm}^2$ con el *sustrato 2*, mientras que para el tiabendazol fue posible detectar $0,20 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ empleando el *sustrato 1* y $1,0 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ con el *sustrato 2*. Adicionalmente, mediante el análisis comparativo de los espectros Raman y SERS, junto con la literatura reportada, se lograron proponer los mecanismos de adsorción de las moléculas de tiram y tiabendazol sobre la superficie de las NPs de plata.