



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI CHIMICA

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

TITOLO DELLA TESI

Relatore: Dr. Lucio Litti

Laureando: Niccolò Marchi
2019452

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

<i>Abstract</i>	3
1-MEROCIANINE e LORO CHIMICA	4
2-STUDIARE LE REAZIONI CON RAMAN e SERS	6
<i>2.1 La spettroscopia Raman</i>	6
<i>2.2 L'effetto SERS</i>	9
<i>2.3 Substrati SERS</i>	12
<i>2.4 Monitorare le reazioni con la spettroscopia Raman</i>	13
3-SET UP SPERIMENTALE	14
<i>3.1 I substrati</i>	14
<i>3.1.1 Stampa ink-jet</i>	14
<i>3.1.2 Drop-casting</i>	15
<i>3.1.2 Substrati colloidali</i>	15
<i>3.2 Monitorare le reazioni della merocianina</i>	16
<i>3.2.1 Spettri di riferimento</i>	17
<i>3.2.2 Studio della fotoacidità in condizioni dinamiche</i>	19
4-CONCLUSIONI	20
5-BIBLIOGRAFIA	21

Abstract

Le specie molecolari che subiscono reversibilmente la dissociazione dei protoni acidi in seguito a stimolazione elettromagnetica (*i.e.* luminosa) vengono chiamate “fotoacidi”. Questo controllo remoto dei loro equilibri acido/base potrebbe fornire un modo per trasformare l’energia luminosa in altri tipi di energia. In questo senso, le merocianine, un fotoacido sotto studio da pochi anni, risultano essere ottimi candidati, riuscendo a produrre alte concentrazioni di protoni con alta efficienza e buona reversibilità in soluzione acquosa, non acquosa, ed altresì quando inglobato in materiali polimerici. Non meno importante, le merocianine mostrano attività con lunghezze d’onda tipiche dello spettro visibile.

Scopo di questa tesi è approfondire l’evoluzione e la cinetica di questa specie in soluzione acquosa, tramite l’utilizzo della spettroscopia Raman e della tecnica SERS.

1-MEROCIANINE e LORO CHIMICA

Le merocianine sono una classe di coloranti organici di profondo interesse per le loro particolari proprietà fotocromatiche e fotoacide. Queste stanno infatti acquisendo sempre più attenzione in svariati campi di ricerca, tra cui le nanotecnologie, la chimica supramolecolare, la scienza dei materiali, le macchine molecolari e tanti altri.

Le merocianine protonate (MCHs) sono composti spiropiranici che esprimono fotocromismo negativo (*figura 1*) associato a un cambiamento dell'acidità: da debole, con una costante di acidità prossima alla neutralità ($pK_a^{GS} \approx 6-7$), a forte, con una costante $pK_a^{MS} \approx 2-3$ (fotoacidità).^[1] In parole povere, queste molecole possono essere utilizzate per controllare i processi di trasferimento protonico tramite la luce.

Ci si riferisce spesso a questo tipo di composti con l'espressione "fotoacido metastabile", cioè una specie la cui dissociazione protonica è abbastanza persistente da essere efficacemente e reversibilmente accoppiata con la reazione di trasferimento protonico in soluzione.

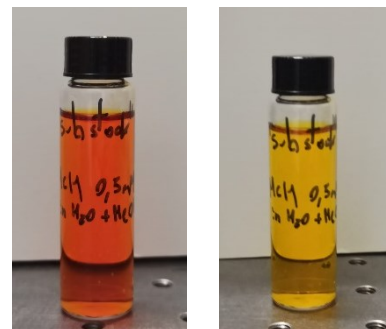


Figura 1 Soluzione preparate in laboratorio (MCH in acqua+metanolo) prima (sx) e dopo (dx) illuminazione con luce led. Si nota bene l'effetto fotocromatico negativo.

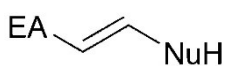


Figura 2 Struttura generica di una merocianina.

Dal punto di vista strutturale, i fotoacidi metastabili sono tipicamente progettati abbinando un elettrone-accettore con un nucleofilo debolmente acido tramite un doppio legame (*figura 2*). Nel caso specifico delle merocianine, il gruppo EA è un indolo zwitterionico ed il NuH un fenolo.^[2]

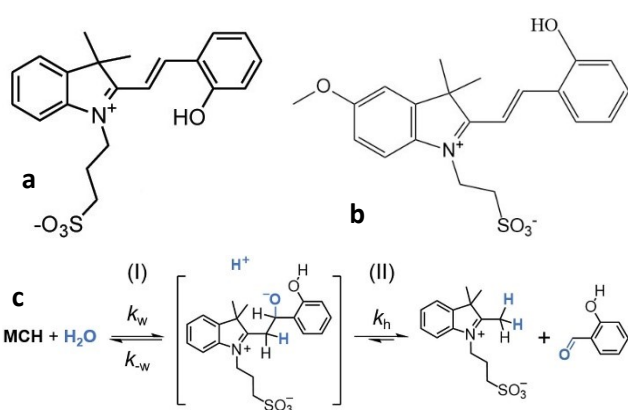
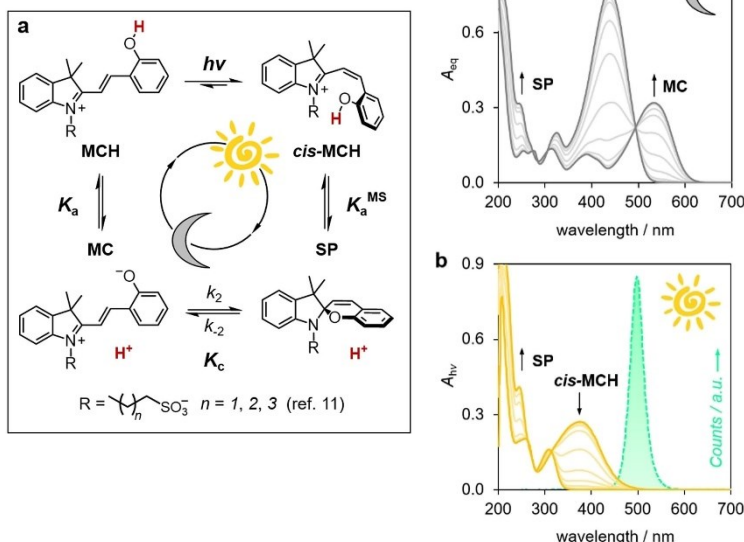


Figura 3 a) fotoacido di Liao;^[3] b) merocianina usata in laboratorio (MM=415g/l) e c) la reazione di idrolisi tipica delle merocianine.

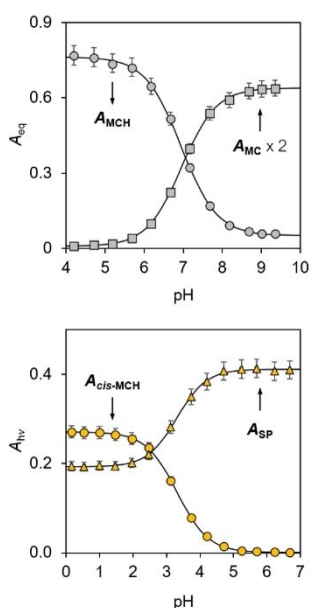
La merocianina largamente più studiata è quella di Liao (*figura 3a*) (con un gruppo propil-solfonato legato all'azoto della metà indolica).^[3] Tuttavia, durante questo lavoro di tesi, si è usata una speciale versione funzionalizzata con un gruppo metossile in *para*- alla metà indolica (*figura 3b*). Quest'ultima, infatti, è stato dimostrato essere più resistente all'idrolisi irreversibile, che tende a formare MCH in soluzione acquosa (sfavorendo gli attacchi nucleofili) (*figura 3c*).^[1]

Questa versione della molecola è stata gentilmente fornita dal gruppo di lavoro del Dr. Cristian Pezzato



L'irraggiamento ad una lunghezza d'onda opportuna, tipicamente nel visibile, induce l'isomerizzazione cis-trans del doppio legame, permettendo alla reazione di ciclizzazione nucleofila di avvenire fra le due parti, generando una forma metastabile fortemente acida che rilascia un protone. Al buio (GS), la forma metastabile (MS) rilascia e riacquisisce il protone (figura 4a). Parliamo quindi di un equilibrio a 4 specie totali, ognuna avente spettro UV-vis differente. Al buio si possono osservare 3 specie a seconda del pH, mentre sotto irraggiamento le specie osservabili sono solo 2 (figura 4b).

Figura 4 a) modello a quattro stati che descrive la reattività di MCH in acqua. b) spettri UV/Vis di 3b al buio e sotto irraggiamento (550 nm) come funzione del pH. [3]



Entrando nel merito del caso studiato, si riportano in tabella 1 i valori delle costanti per la molecola da noi utilizzata, trovati tramite analisi UV-vis (figura 5) e/o $^1\text{H-NMR}$.^[1] La lunghezza d'onda di irraggiamento usata per lo studio della forma metastabile è 500 nm: a questa lunghezza d'onda è stata riscontrata la maggiore fotoacidità ($\Pi = \text{p}K_a^{\text{GS}} - \text{p}K_a^{\text{MS}}$), mantenendo la resa quantica pressoché invariata rispetto ad altre lunghezze d'onda ($\Phi_{500} = 0.40 \pm 0.03$). È interessante notare come la $\text{p}K_a^{\text{GS}}$ non solo sia influenzata dall'equilibrio di dissociazione di MCH, ma anche dall'equilibrio di ciclizzazione della forma dissociata. Si instaura quindi un equilibrio a tre termini. Nello specifico l'equazione che collega il tutto è:

$$K_a^{\text{GS}} = K_a(1 + K_c).^{[1]} \quad (\text{eq.1})$$

Figura 5 Profilo di assorbanza ottenuto di MCH (437 nm), MC (534 nm) al buio; e cis-MCH (375 nm) e SP (225 nm) illuminati a 500 nm. La linea solida è il miglior fitting dell'equazione sigmoide di Boltzmann. [3]

Tabella 1 Valori delle costanti di equilibrio degli equilibri di MCH in soluzione acquosa

$\text{p}K_a^{\text{GS}}$ (UV-Vis)	$\text{p}K_a^{\text{Dark}}$ (NMR)	K_c (NMR)	$\text{p}K_a^{\text{GS}}$ (calc. eq. 1)	$\text{p}K_{a,500}^{\text{MS}}$ (UV-Vis)
6.95 ± 0.03	7.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	7.0 ± 0.1	3.31 ± 0.04

La conoscenza di questi dati sarà fondamentale per la comprensione del lavoro svolto in laboratorio, presentato più avanti.

2-STUDIARE LE REAZIONI CON RAMAN e SERS

Più in avanti nell'elaborato si discuterà come monitorare le reazioni tramite l'utilizzo della tecnica SERS. La prima parte di questo capitolo viene quindi dedicata ad una breve introduzione a questa tecnica.

2.1 La spettroscopia Raman

L'effetto Raman è stato per la prima volta osservato da C.S. Raman (1888-1970) nel 1921, in India (gli valse il premio Nobel nel 1930) attraverso strumenti ottici, diremmo oggi, molto rudimentali. Usando come sorgente la luce solare e come rivelatore i suoi stessi occhi, si accorse di come la luce diffusa avesse colore differente dalla luce incidente. È a lui che ad oggi dobbiamo una delle tecniche di analisi più versatili: la spettroscopia Raman.



Figura 6 Il primo spettrografo Raman

La spettroscopia (di scattering) Raman è, come l'IR, una spettroscopia vibrazionale. Al contrario dell'IR però lavora sulle lunghezze d'onda dell'UV-vis, offrendo altri numerosi vantaggi, come la facilità della misura (spesso la preparazione del campione si riduce a pochi e banali passaggi) e il fatto che possano essere analizzate soluzioni acquose (impossibile con IR). Lo scattering, per definizione, è la diffusione della radiazione elettromagnetica in seguito a interazioni con la materia (figura 7).^[4]

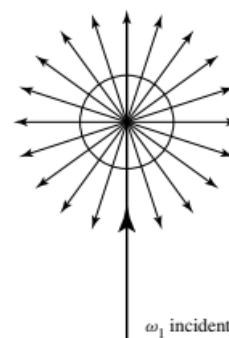


Figura 7 Schema stilizzato dello scattering di radiazione e.m.

In altri termini, lo scattering può essere approssimato come l'assorbimento di un fotone incidente e la simultanea emissione di un altro fotone (detto "scatterato"). Questo processo potrebbe sembrare simile alla fluorescenza, ma la discriminante fra i due fenomeni sta proprio nell'istantaneità del primo, mentre la fluorescenza coinvolge uno step intermedio (un'eccitazione elettronica seguita dall'emissione di un fotone). Lo scattering può quindi avvenire senza un diretto assorbimento e, quindi, anche quando non esistono livelli elettronici corrispondenti all'energia del fotone incidente. Graficamente, lo scattering si può rappresentare come in figura 8, con l'assorbimento del fotone incidente e un conseguente eccitamento della molecola a uno stato eccitato **virtuale**. Lo stato virtuale, nella maggior parte dei casi, non ha un vero significato fisico, ma va considerato come un costrutto matematico che ben si allinea alla teoria quantomeccanica.

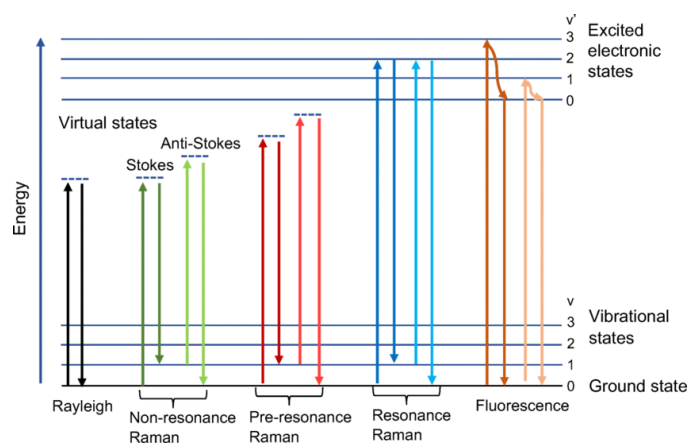


Figura 8 Diagramma di Jablonski per diversi tipi di transizioni [5]

Come anticipato dalla *figura 8*, la radiazione scatterata ha tipicamente 3 diverse componenti date da 2 diversi tipi di scattering:

- Scattering **Rayleigh** (elastico): in cui i fotoni incidenti e scatterati hanno la stessa energia, ma tipicamente direzione e/o polarizzazione diverse. È la componente di gran lunga predominante.
- Scattering **Raman** (anelastico): in cui i fotoni scatterati hanno energia diversa da quella dei fotoni incidente. La differenza di energia corrisponde a una transizione fra 2 stati vibrazionali (o rotazionali) nella molecola. Se l'energia del fotone scatterato è minore di quella del fotone incidente, allora lo scattering si definisce **Stokes** ed è dovuto ad un rilassamento a un livello vibrazionale ad energia maggiore di quello di partenza. Se invece l'energia del fotone scatterato risulta essere maggiore di quella del fotone incidente, lo scattering si definisce **anti-Stokes** ed è dovuto a un rilassamento a un livello vibrazionale inferiore del livello iniziale.

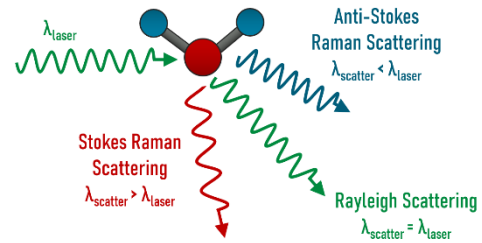


Figura 9 Scattering Raman. [6]

Se l'energia del livello intermedio corrisponde all'energia di un vero livello vibronico della molecola, si parla di scattering Raman di risonanza. Questo tipo di effetto può amplificare di diversi ordini di grandezza l'efficienza della diffusione.^[7] In condizioni normali, la diffusione di Stokes è ampiamente più intensa. Questo deriva dal fatto che, all'equilibrio termico, gli stati vibrazionali più bassi sono maggiormente popolati rispetto agli stati eccitati, come descritto dalla distribuzione di Boltzmann, riportata in equazione 2.

$$\frac{I_{stokes}}{I_{anti-stokes}} = \frac{(v_0 - v_1)^4}{(v_0 + v_1)^4} e^{\frac{hv_1}{kT}} \quad (eq.2)$$

Secondo la derivazione data dalla meccanica classica, lo scattering è legato alla variazione della polarizzabilità della molecola.

Il campo elettrico associato a un'onda elettromagnetica (e.m.) oscilla nel tempo secondo l'espressione:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \quad (eq.3)$$

Con E_0 ampiezza massima e ω_0 la pulsazione dell'onda ($\omega_0 = h\nu_0$ con ν_0 frequenza dell'onda).

Quando una molecola viene irradiata da un'onda e.m., la nuvola elettronica viene spostata dando luogo a un momento di dipolo elettrico indotto P di entità

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} = \alpha \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \quad (eq.4)$$

in cui α è una funzione detta polarizzabilità, e fornisce una misura della responsività della nube elettronica della molecola in presenza di un campo elettrico.

Se la molecola sta vibrando con una frequenza ν_m , lo spostamento nucleare q può essere riscritto secondo l'approssimazione dell'oscillatore armonico come

$$q = q_0 \cos(\omega_m t) \quad (eq.5)$$

dove q_0 è l'ampiezza vibrazionale.

Questa vibrazione si ripercuote sulla polarizzabilità che, per piccole vibrazioni, può essere descritta con uno sviluppo di Taylor troncato al primo termine dello spostamento nucleare q :

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q + (\dots) = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \cos(w_m t) \quad (eq.6)$$

con α_0 polarizzabilità nella posizione di equilibrio e $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0$ fornisce la variazione di α in funzione della distorsione nucleare q nel punto di equilibrio.

Come è facile notare dall'equazione precedente, le vibrazioni modificano la polarizzabilità in modo periodico nel tempo.

Espandendo l'espressione per il momento di dipolo combinando insieme le eq.4-5-6, si ottiene

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(w_0 t) + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \cos(w_m t) \vec{E}_0 \cos(w_0 t) \quad (eq.7)$$

Che, utilizzando le formule trigonometriche di Werner, diventa:

$$\begin{aligned} \vec{P} &= \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(w_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[(w_0 + w_m)t] + \cos[(w_0 - w_m)t] \} = \\ &= \underbrace{\alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)}_{\text{Rayleigh}} + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \vec{E}_0 \left\{ \underbrace{\cos[2\pi(\nu_0 + \nu_m)t]}_{\text{anti-Stokes}} + \underbrace{\cos[2\pi(\nu_0 - \nu_m)t]}_{\text{Stokes}} \right\} \end{aligned} \quad (eq.8)$$

Quest'ultima espressione riassume perfettamente il fenomeno dello scattering. Il dipolo indotto dal campo elettrico incidente è **oscillante**, e in quanto tale emette radiazione elettromagnetica a 3 diverse componenti: Rayleigh, con la stessa frequenza della radiazione incidente, Raman Stokes, con $\nu = \nu_0 - \nu_m$, e Raman anti-Stokes, con $\nu = \nu_0 + \nu_m$. $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0$ è la regola di selezione per gli spettri Raman. Se rispettata, il modo vibrazionale è detto Raman-attivo. Si ricorda la diversa regola di selezione per lo spettro IR: $\left(\frac{\partial\mu}{\partial q}\right)_0 \neq 0$. Le due tecniche forniscono, quindi, informazioni differenti e complementari.^[8]

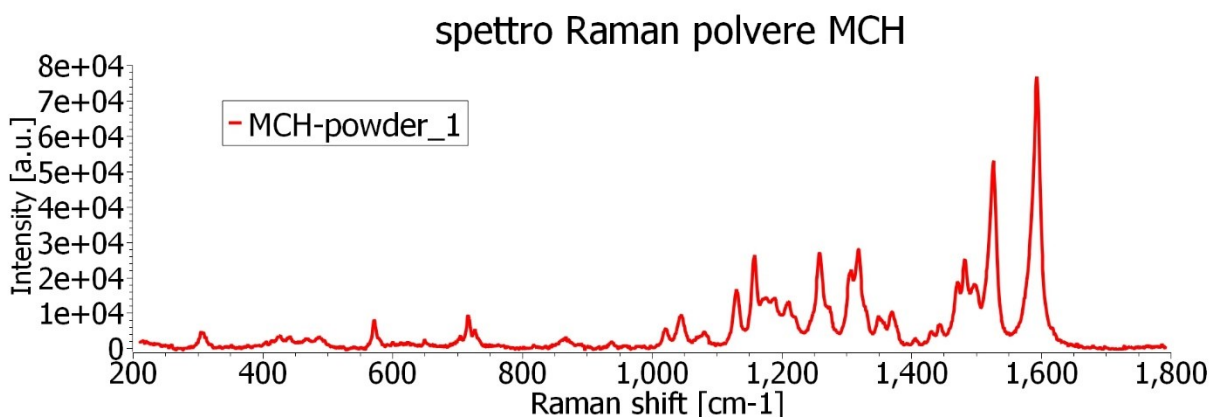


Figura 10 Spettro Raman della polvere di MCH. λ incidente=633 nm.

Un tipico spettro Raman (come quello in figura 10) riporta in ordinata l'intensità del segnale, e in ascissa il Raman shift, ovvero la differenza di energia fra la luce incidente e la luce scatterata, espressa come numero d'onda [cm^{-1}]. Questo spettro è, come spesso viene detto anche per gli spettri IR, una

“impronta digitale” della molecola ed è, infatti, univoco per ogni molecola. Ad ogni picco corrisponde un modo vibrazionale di numero d’onda riportato nelle ascisse. Tipicamente vengono rilevati solo i picchi Stokes, essendo più intensi per i motivi già citati e fornendo di fatto le stesse informazioni dei picchi anti-Stokes in termini di modi vibrazionali. La dipendenza dell’intensità dei picchi dalla concentrazione dei campioni la rende, all’occorrenza, anche una tecnica di analisi quantitativa.

Nonostante gli innumerevoli vantaggi che offre questa tecnica, ci sono delle limitazioni che possono rendere particolarmente difficili l’acquisizione di uno spettro Raman con apprezzabile rapporto segnale/rumore. Di seguito si riportano i due più importanti limiti e le possibili soluzioni:

1. alcune molecole o materiali emettono fluorescenza, col rischio di coprire i segnali Raman. È perciò opportuno scegliere la frequenza eccitatrice lontana dalle frequenze di assorbimento (in modo tale che non manifesti fluorescenza).
2. Il segnale Raman è intrinsecamente molto debole, è necessario perciò utilizzare sorgenti elettromagnetiche molto potenti. Tipicamente vengono infatti utilizzati potenti laser, che potrebbero però causare surriscaldamenti o fotodecomposizione. Per amplificare maggiormente i segnali si può usare anche la tecnica SERS.

2.2 L’effetto SERS

Il Surface Enhanced Raman Scattering, o SERS, è un effetto che amplifica di diversi ordini di grandezza (fino a 10^9 volte) i segnali Raman (figura 11), grazie all’adsorbimento delle molecole Raman-attive su materiali plasmonici, cioè superfici o nanoparticelle metalliche che mostrano una risonanza plasmonica di superficie localizzata (LSPR).

Il meccanismo alla base di SERS è complicato e ancora oggetto di studio. Da quando è stato scoperto, nel 1974, sono state proposte diverse interpretazioni. Ogni modello fornisce una prospettiva unica riguardo al meccanismo di funzionamento e possono essere usati in modo complementare per comprendere al meglio ogni aspetto dell’amplificazione. Le due teorie più accreditate ad oggi sono la teoria elettromagnetica e la teoria chimica.

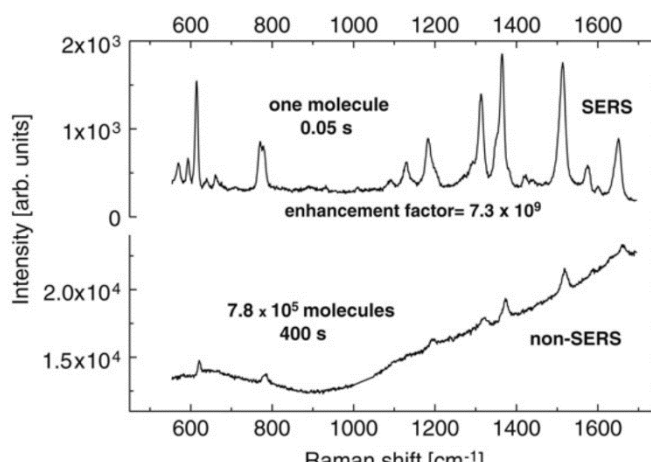


Figura 11 Spettri Raman e SERS a 633nm per rodamina 6G [9]

La **teoria elettromagnetica** individua come causa dell'amplificazione la formazione di plasmoni di superficie localizzati (LSP) sulle nanoparticelle metalliche. In condizioni normali, la superficie dei metalli è caratterizzata dalla presenza di elettroni liberi appartenenti alla banda di conduzione. Quando un campo elettromagnetico viene applicato al sistema, la sua interazione con questa densità elettronica genera una oscillazione collettiva coerente degli elettroni del metallo con il campo elettromagnetico della luce incidente (figura 12), detta

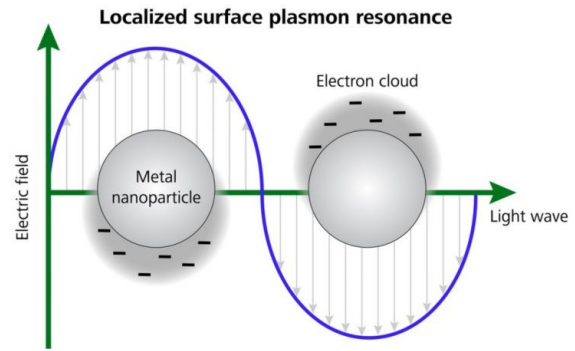


Figura 12 rappresentazione schematica di LSP [10]

plasmon di superficie. Per particelle molto piccole, dalla grandezza inferiore alla lunghezza d'onda della luce incidente, l'oscillazione è confinata dalle dimensioni della particella, e si parla di plasmon di superficie localizzato, LSP. A una determinata frequenza, l'oscillazione è in risonanza con la luce incidente, e nei pressi della nanostruttura si forma forte campo elettrico locale indotto dal plasmon. A questa frequenza caratteristica, i plasmoni assorbono e scaterano la luce in modo più efficace. Per le nanoparticelle d'oro, questa frequenza di risonanza è situata nella regione visibile del campo elettromagnetico, ed è il motivo per cui soluzioni di NP d'oro risultano colorate. Oltre al tipo di metallo, la frequenza di risonanza dipende dalla forma e dalle dimensioni delle NP.

Una molecola in prossimità della superficie, quindi, risentirà di un campo elettromagnetico amplificato e i segnali Raman risulteranno anch'essi amplificati (vedi eq.4).^[7]

Il fenomeno può essere ben razionalizzato usando il modello semplificato di una sfera metallica di piccole dimensioni (raggio inferiore alle dimensioni della lunghezza d'onda incidente) in un campo elettromagnetico E_0 esterno. Il campo indotto sulla superficie del metallo in questa situazione, per l'approssimazione elettrostatica (Rayleigh), risulta essere:^[11]

$$E_{sup} = \frac{\varepsilon(\nu_l) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu_l) + 2\varepsilon_0} E_0 \quad (eq.9)$$

con $\varepsilon(\nu_l)$ funzione complessa dipendente dalla frequenza della particella metallica e ε_0 permittività relativa dell'ambiente.

Per una particella di raggio r e una molecola posta a distanza d dalla sua superficie, il campo elettrico indotto percepito da tale molecola sarà quindi:^[12]

$$E_{SP}(d) = \frac{\varepsilon(\nu_l) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu_l) + 2\varepsilon_0} \left(\frac{r}{r+d}\right)^3 E_0 \quad (eq.10)$$

E_{SP} ha valore massimo quando $d=0$ e quando $\varepsilon(\nu_l) \sim -2\varepsilon_0$ (condizioni di risonanza).

Totalmente, in presenza di un sistema plasmonico, una molecola nelle sue vicinanze è influenzata da un campo locale E_{loc} pari alla somma di E_0 e E_{SP} .

È interessante notare come il maggiore aumento del segnale derivi da regioni in cui il campo magnetico si può accumulare, come nella giunzione fra due particelle o sulle punte. In queste zone, dette *hot spot*, si ha interferenza costruttiva tra le risonanze

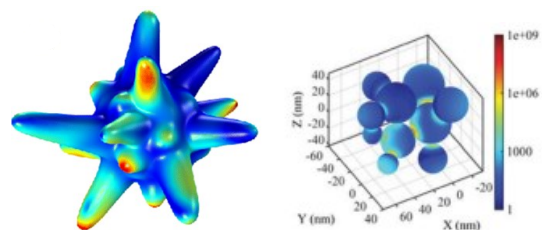


Figura 13 amplificazione del campo locale per nanostar (sx) [14] e aggregati di particelle (dx) [15] d'oro

plasmoniche o, per le particelle con una determinata morfologia, effetto punta (*figura 13*).^[13] La **teoria chimica**, invece, trova come spiegazione dell'amplificazione la modificazione della polarizzabilità della molecola adsorbita dovuta allo stretto legame che questa crea con il metallo. Il legame rende possibile il trasferimento di carica (elettroni o lacune) tra metallo e molecola. Per la precisione, i meccanismi che si sono rivelati più importanti sono:^[7]

1. A seguito della formazione del complesso metallo-analita, la parziale sovrapposizione degli orbitali crea nuovi stati elettronici che, se in risonanza con la luce incidente, portano all'amplificazione del segnale (come già accennato nel capitolo 2.1 la spettroscopia Raman di risonanza è ordini di grandezza più intensa) (*figura 14, Metal-complex*).
2. Sempre a causa dello stretto legame metallo-analita, quando i livelli HOMO e LUMO della molecola cadono simmetricamente intorno al livello di Fermi del metallo, se il laser entra in risonanza con il gap HOMO-livello di fermi, c'è spostamento di carica tra i livelli HOMO-LUMO mediato dal metallo (è richiesta metà dell'energia), e conseguente cambiamento della polarizzazione (*figura 14, Charge-transfer*).

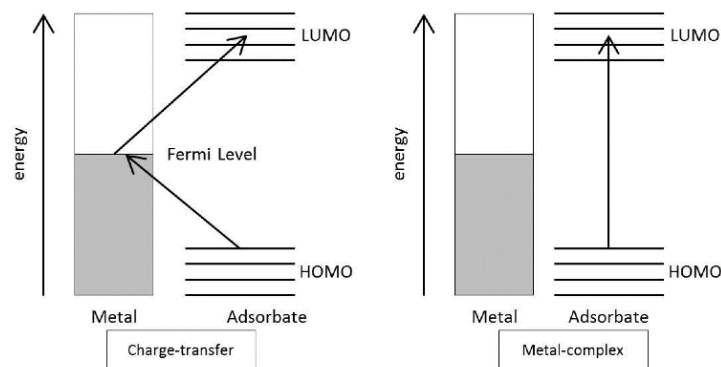


Figura 14 rappresentazione schematica dei meccanismi 1 e 2 della teoria chimica [16]

Nonostante ci siano diverse evidenze sperimentali che provano entrambe le teorie, il contributo prevalente deriva dal meccanismo elettromagnetico.

2.3 Substrati SERS

Essendo il substrato la parte fondamentale dell'effetto SERS, scegliere il giusto substrato è cruciale durante il lavoro sperimentale in modo da avere risultati precisi e affidabili. Per questo un substrato SERS per essere considerato buono deve essere altamente riproducibile, chimicamente stabile e avere proprietà ottiche e di campo uniformi e prevedibili.

Nonostante esistano svariati tipi di substrati e ancor più svariate tecniche di sintesi, in questo elaborato si prenderanno in considerazione i substrati che è stato possibile testare in laboratorio: substrato a film sottile per stampa ink-jet, film per drop-casting (substrati solidi) e substrato colloidale.

I substrati solidi sono fatti per deposizione di nanoparticelle metalliche su una superficie solida come vetro o quarzo. Sono generalmente facili da maneggiare e chimicamente stabili, nonostante possano essere affetti da corrosione.

- La stampa ink-jet (figura 15) è forse la tecnica più innovativa delle tre citate. I vantaggi di questo genere di tecnica rispetto a tutte le altre sono svariati: è scalabile, facile da utilizzare, riduce al minimo lo spreco di inchiostro (che essendo generalmente fatto di metalli preziosi risulta essere piuttosto oneroso), ha una elevata versatilità nei confronti della superficie di deposizione ed è altamente riproducibile. L'inchiostro necessario per permettere la stampa è sostanzialmente una dispersione colloidale di nanoparticelle metalliche contenenti additivi, come il glicerolo, per assicurarne la stabilità.^[17]

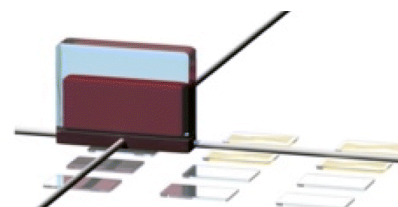


Figura 15 stampa ink-jet su vetro [17]

- Il drop-casting invece è una tecnica molto più facile e dai costi (strumentali) molto meno onerosi, a discapito però dell'omogeneità e della riproducibilità del substrato. La tecnica consiste sostanzialmente nella deposizione manuale della soluzione di nanoparticelle sulla superficie solida, e della successiva evaporazione del solvente tramite riscaldamento.

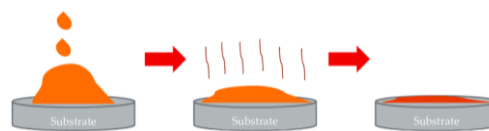


Figura 16 schema drop-casting [19]

- La fase di riscaldamento è fondamentale e non è banale, è difatti necessario evitare l'effetto coffee ring,^[18] ovvero la migrazione delle nanoparticelle verso il perimetro della goccia, che porta a un substrato non uniforme. Per questo, la fase di asciugatura richiede comunque dell'attrezzatura adeguata che permetta il riscaldamento ad alte temperature e in maniera ventilata, in modo tale da accelerare l'evaporazione.

- I substrati colloidali, infine, sono tipicamente i più usati. Sono, sostanzialmente, sospensioni stabili di nanoparticelle metalliche in un mezzo liquido come l'acqua. Questo genere di substrati associa i bassi costi e la facilità nella preparazione con l'alta riproducibilità. A discapito di questo, però, le soluzioni colloidali sono soggette ad una perdita di stabilità. Ad esempio, il più grande problema riguarda il controllo delle aggregazioni: al fine di avere degli hotspot è necessario far aggregare le particelle, ma non troppo, perché cluster troppo grandi di particelle potrebbero portare a una diminuzione della attività plasmonica a causa di una peggiore dispersione.

2.4 Monitorare le reazioni con la spettroscopia Raman

Riuscire a monitorare in modo accurato l'evoluzione di una reazione è fondamentale per studiare la dinamica delle stesse. Tramite l'utilizzo della spettroscopia Raman, le informazioni di natura vibrazionale ricavabili possono essere utilizzate per acquisire informazioni riguardo struttura, cinetica e interazioni molecolari dei sistemi chimici.^[20] La possibilità di lavorare in situ permette di poter seguire la reazione in modo continuativo e in tempo reale, nonché di ridurre la manipolazione del campione.

Le tecniche di monitoraggio si basano sull'acquisizione di spettri ad intervalli regolari di tempo, permettendo così il confronto dei picchi durante il decorso della reazione. Ulteriori vantaggi della spettroscopia Raman riguardano la possibilità di monitorare contemporaneamente diverse regioni del campione (il così detto imaging) rendendo possibile la mappatura della distribuzione delle varie specie chimiche durante la reazione. Questo genere di informazioni possono risultare di estrema utilità, per esempio, nello studio di un catalizzatore.

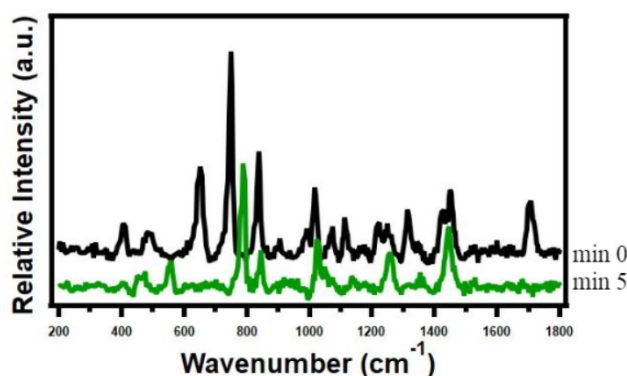


Figura 17 spettri Raman riguardo la riduzione del cicloesanoone usando DMBA in acqua. [21]

Nella pratica, questo genere di studi possono essere utilizzati per ottenere informazioni riguardo:

- Meccanismi di reazioni (e possibile confronto con meccanismi teorizzati)
- Rilevazioni di intermedi di reazione
- Studi cinetici riguardanti la concentrazione delle specie chimiche nel decorso della reazione (monitorando l'intensità dei picchi)
- Comprendere variazioni strutturali e conformazionali di alcune molecole
- Confrontare diverse condizioni sperimentali.

3-SET UP SPERIMENTALE

In questo capitolo si espone il design sperimentale oggetto di questa tesi. Nel sottocapitolo 3.1 si presenta la produzione di tre tipologie di substrati SERS che hanno portato all'individuazione di uno come il migliore in termini di praticità ed efficacia; mentre nel sottocapitolo 3.2 si presenta effettivamente lo studio degli equilibri di fotoacidità della merocianina. Questo capitolo si compone di esperimenti portati a termine e design sperimentali che non è stato possibile attuare a causa della mancanza di tempo, ma che costituiscono la base per un possibile futuro del progetto.

3.1 I substrati

La prima parte del lavoro sperimentale si è concentrata nella produzione dei diversi substrati già brevemente descritti precedentemente.

3.1.1 Stampa ink-jet

Reagenti:

- soluzione acquosa di nanoparticelle d'oro funzionalizzate con PEG_{5kDa}-SH (precedentemente centrifugate per eliminare le componenti più grosse)
- etilen glicole 10%
- tween 20

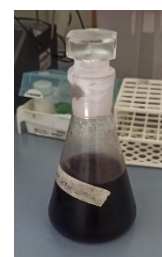


Figura 18 NP d'oro funzionalizzate PEG-SH

Procedura:

1. inizialmente, la soluzione di NP è stata concentrata tramite una sequenza di tre centrifughe a 3000 RCF per 30 minuti ognuna. Dopo ogni centrifugazione veniva eliminato il surnatante e sostituito con della nuova soluzione. Alla fine, è stata collezionata la fase più concentrata.
2. Si controlla la formazione di aggregati all'interno dell'inchiostro ottenuto tramite spettro UV-Vis
3. Alla fase rimasta, viene aggiunto etilen glicole al 10% per migliorarne la viscosità e 2/3 ml di tween 20, un tensioattivo necessario per evitare la formazione di aggregati.
4. Si carica la cartuccia con l'ausilio di una siringa
5. Tramite l'utilizzo della stampante Dimatix, è stato stampato uno spot di 1mm² (sovrapponendo 6 strati) su vetrino (figura 19).
6. Si è applicato un pozzetto di plastica (necessario per contenere il campione) con una colla bicomponente a base siliconica.

Discussione: la presenza di aggregati all'interno dell'inchiostro caricato in cartuccia potrebbe portare all'ostruzione degli ugelli della stessa. Come si nota dalla figura 20 il metodo utilizzato per concentrare le nanoparticelle si è dimostrato efficace nell'evitarne la formazione, difatti la curva cala velocemente, senza presentare spalle nella regione verso l'IR (che invece indicano la presenza di aggregati di grandi dimensioni).



Figura 19 spot da stampa Ink-jet

Nonostante il successo nella produzione del substrato, i lunghi tempi di attesa e la difficoltà nell'acquisire familiarità con la stampante hanno fatto virare la scelta del substrato su un metodo più semplice e veloce.

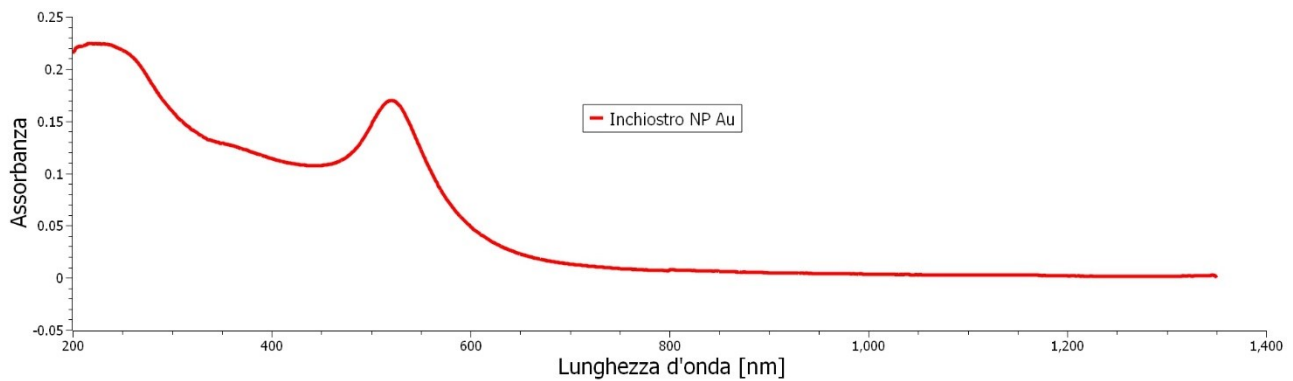


Figura 20 spettro di assorbimento UV-vis dell'inchiostro finito usato per i substrati solidi

3.1.2 Drop-casting

Reagenti:

- Inchiostro di NP d'oro preparato come esposto precedentemente

Procedura:

1. Si ripetono i punti 1-3 del protocollo esposto per la stampa ink-jet per preparare l'inchiostro
2. Si deposita una goccia di inchiostro sul vetrino di supporto
3. Tramite l'utilizzo della piastra riscaldante a 100°C si fa evaporare gran parte del solvente
4. Si cuociono i vetrini in forno a 250°C per 3 ore, mantenendo la ventilazione
5. Si applica il pozzetto in plastica con l'ausilio della colla siliconica bicomponente.

Discussione: la tecnica del drop-casting si è rivelata, come previsto, molto più veloce rispetto alla tecnica ink-jet. Ciò nonostante, è stato possibile verificare anche tutte le sue criticità: gli spot, creati dalla deposizione della goccia di inchiostro, sono risultati non più piccoli di 1cm², con un conseguente aumento della quantità di inchiostro necessario. Inoltre, tramite ispezione al microscopio ottico, era evidente come il substrato fosse molto disomogeneo, ed è risultato perciò fondamentale eseguire misure in diversi punti del substrato per verificarne le prestazioni.



Figura 21 spot da drop-casting

A causa di un probabile problema di contaminazione che ha riguardato il batch di inchiostro usato in quel periodo, non è stato possibile ottenere dei buoni spettri usando questi substrati. Si sono perciò indirizzati i nostri sforzi nell'acquisizione degli spettri tramite substrati colloidali.

3.1.2 Substrati colloidali

Reagenti:

- soluzione acquosa di nanoparticelle d'oro ottenute per ablazione laser in flusso continuo
- PBS (0,01M di fosfato di Na, 0,138 M di NaCl e 0,0027 M di KCl)

Procedura:

1. Si miscela una ugual aliquota di campione e colloide di AuNP e tampone PBS
2. Si centrifuga la miscela a 30'000 RCF, in modo da separare efficacemente la gran parte delle particelle

3. Si re-disperde la fase sedimentata mediante sonicazione e si procede con l'acquisizione di spettri Raman tramite l'utilizzo di una cuvetta

Discussione: questa tipologia di substrati si è dimostrata di gran lunga la più veloce da fare. L'utilizzo della soluzione ionica è necessario per favorire l'aggregazione delle nanoparticelle (l'aumento della forza ionica fa diminuire l'ampiezza del doppio strato elettrico, conseguentemente favorisce l'aggregazione).

Anche per questo ultimo genere di substrati non è stato possibile, purtroppo, riuscire ad acquisire nessuno spettro analizzabile.

3.2 Monitorare le reazioni della merocianina

Il sistema di fotociclicità di queste molecole è piuttosto complicato, come richiamato in *figura 4*, essendo composto da più equilibri simultanei influenzati anche dalla presenza o meno di illuminazione. In generale, quindi, ci si aspetta degli spettri composti dalla somma di contributi di molecole diverse. Per poter analizzare questo genere di sistemi è opportuno acquisire gli spettri di più specie pure possibili.

Per questo motivo, la seconda parte del lavoro in laboratorio è divisa in due fasi:

- 1) l'acquisizione degli spettri SERS di riferimento di tutte le specie isolabili
- 2) l'acquisizione **in continuo** degli spettri SERS del campione soggetto alla variazione delle condizioni, tali per cui si inducano le reazioni di deprotonazione o isomerizzazione.

Tutte le analisi sono state eseguite con Renishaw InVia μ Raman, laser ad emissione 633 nm.

Si riportano a seguire la *figura 4a* e la *tabella 1* per facilitare il proseguire della lettura.

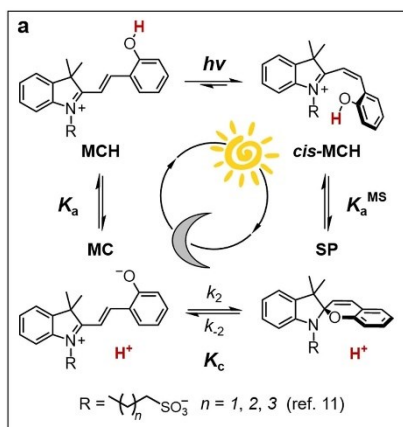


Figura 4a (sopra) e tabella 1 (sotto)

pK_a^{GS} (UV-Vis)	pK_a^{Dark} (NMR)	K_c (NMR)	pK_a^{GS} (calc. eq. 1)	$pK_{a,500}^{MS}$ (UV-Vis)
6.95 ± 0.03	7.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	7.0 ± 0.1	3.31 ± 0.04

3.2.1 Spettri di riferimento

In accordo con l'equazione di **Henderson-Hasselbalch** (eq. 11) si può isolare una delle due specie di un equilibrio acido-base semplicemente regolando il pH della soluzione (figura 22).

$$pH = pKa - \log\left(\frac{\text{forma acida}}{\text{forma basica}}\right) \quad (\text{eq.11})$$

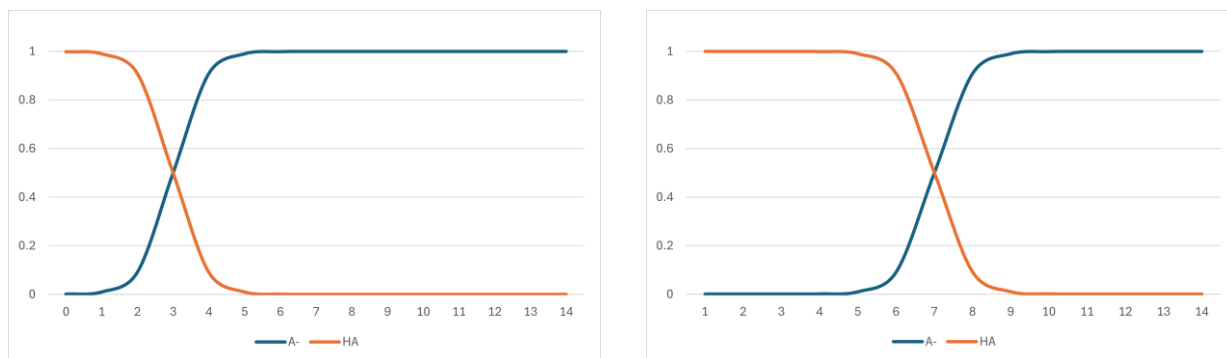


Figure 22 Grafici frazione vs pH di due acidi generici con $pKa=3$ (sx) e $pKa=7$ (dx)

Nel nostro caso è perciò possibile prendere il riferimento di 3 delle 4 specie appartenenti all'equilibrio di MCH, ad eccezione della forma MC, che esibisce reazione di isomerizzazione a dare SP.

Quanto si descrive in seguito corrisponde al *design of experiment* che si era proposti di seguire. Purtroppo, a causa di una ancora ignota contaminazione nella soluzione madre delle particelle di Au, queste sono risultate non efficaci come substrati SERS e nessuna misura è risultata significativa. Per mancanza di tempo non è stato altresì possibile ripetere le misure con una nuova sintesi di particelle.

3.2.1.1 MCH

La forma protonata della merocianina, nel suo isomero trans, può essere isolata lavorando in ambiente acido e al buio. La molecola in questa forma possiede una pKa circa uguale a 7. Le condizioni di acidità si raggiungono tramite l'utilizzo di una soluzione di HCl. Si preferisce, in prima istanza, evitare l'utilizzo di tamponi (come il fosfato) per non introdurre specie Raman attive nel campione.

Le analisi al μ Raman sono state eseguite al buio onde evitare l'isomerizzazione di MCH.

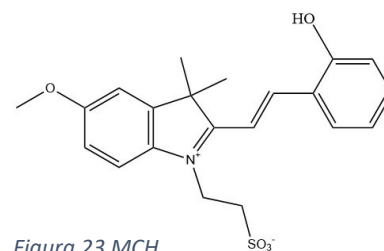


Figure 23 MCH

3.2.1.2 cis-MCH

Utilizzando la stessa soluzione di MCH in ambiente fortemente acido, ma sotto illuminazione, in linea teorica è possibile analizzare selettivamente la forma cis dell'analita. Il pH viene fissato ad 1.7 grazie ad una soluzione 10^{-2} M di HCl. Si trascura la concentrazione di MCH in quanto di tre unità di grandezza inferiore. Per l'equazione 12, e $pK_a=3.3$, il rapporto tra le due forme del cis-MCH risulta essere

$$\frac{\text{forma acida}}{\text{forma basica}} = 39,8$$

che in termini percentuali corrisponde a un 97,55% (in moli) della forma acida in soluzione. Al fine delle misure risulta esserci, quindi, una quantità di forma basica tale per cui gli eventuali picchi dovuti ad essa sono trascurabili.

Per eccitare i fotoacidi è stata usata una normale torcia LED. Per evitare possibili interferenze della torcia (che emette su quasi tutto il visibile) con le misure Raman eccitate a 633 nm, è stato utilizzato un filtro passa basso (figura 25) che assorbe le lunghezze d'onda sopra i 600 nm (figura 26).

Nonostante la molecola mostri fluorescenza, questa non viene significativamente eccitata a 633nm.

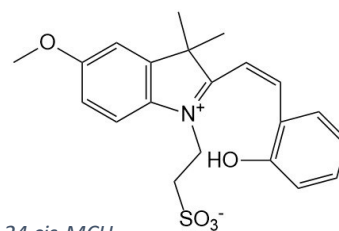


Figura 24 cis-MCH



Figura 25 filtro passa banda

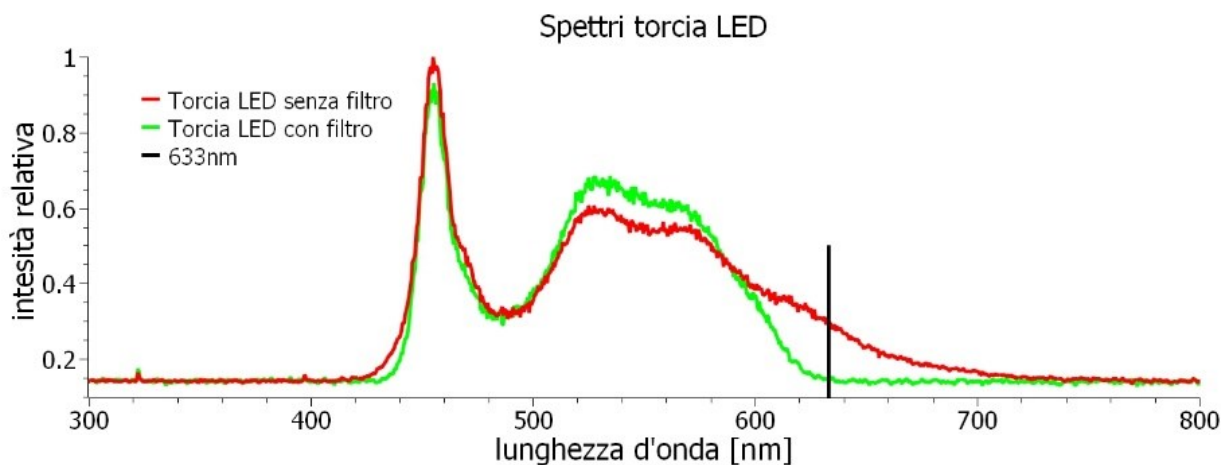


Figura 26 Spettri VIS luce torcia LED con e senza filtro

3.1.1.3 SP

La forma chiusa fa parte di entrambi gli equilibri, sia quello al buio che sotto illuminazione. Per isolarla è conveniente lavorare sotto illuminazione: per pH molto superiori a 3.3, infatti, la forma predominante in soluzione dovrebbe essere proprio quella chiusa. Per assicurare le giuste condizioni di reazione, è stato deciso di fare uso di un tampone fosfato pH=7.3. Una volta caricata nel pozzetto (o in cuvetta) la soluzione viene illuminata per un minimo di venti minuti per assicurarsi la completa isomerizzazione.

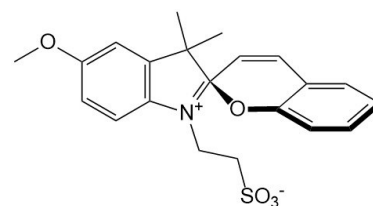


Figura 27 SP

3.1.1.4 MC

La forma aperta deprotonata non è isolabile solamente variando il pH, essendo presente solo nell'equilibrio al buio ed in co-presenza con SP. Per questo, il metodo diretto di acquisizione dello spettro di riferimento non è attuabile. La strategia delineata per individuare possibili picchi caratteristici di MC è la seguente:

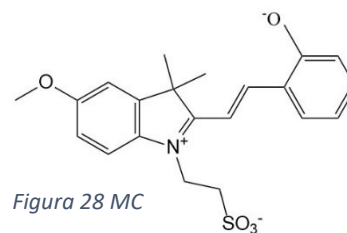


Figura 28 MC

1. Acquisire lo spettro della miscela MC+SP, possibile analizzando al buio una soluzione di MCH in ambiente basico ($\text{pH} \gg 7,4$) da NaOH
2. Confrontare questo spettro con quello della soluzione con solo SP

Il tal modo dovrebbe essere possibile individuare eventuali picchi caratteristici di MC da poter utilizzare durante lo studio degli spettri dell'acquisizione in continuo.

3.2.2 Studio della fotoacidità in condizioni dinamiche

Lo scopo principale della seconda fase è seguire l'evoluzione della reazione in soluzione di MCH in dark, seguendo i seguenti passaggi:

1. Sciogliere MCH a $\text{pH}=3$
2. Avviare il Raman in modalità di acquisizioni in continuo
3. Indurre $\text{pH}=8$ (con l'ausilio di NaOH o un'altra base forte)
4. Seguire per un tempo adeguato l'evolversi della reazione



Figura 29 set up sperimentale per l'acquisizione degli spettri in continuo. Sotto, foto con termocamera del pozzetto termostato

Il tutto eseguito in ambiente termostato a pochi gradi sopra lo zero, per rallentare la cinetica e darci modo di osservare l'evolversi della reazione in maniera più accurata.

Il set-up immaginato per la termostatazione prevede l'utilizzo di un pozzetto dotato di serpentina di raffreddamento (stampato in 3D) e una pompa peristaltica (set-up come in figura 29). L'utilizzo di normale acqua e ghiaccio all'interno del sistema refrigerante si è rivelato essere adatto in virtù della dispersione termica come si vede dalla figura 29. Dai dati ottenuti con la termocamera si è notato che sarebbe stato possibile abbassare ulteriormente la temperatura aggiungendo del sale, essendo la dispersione molto alta, così come la temperatura esterna.

Lo stesso set-up potrebbe ben adattarsi anche ad altre reazioni secondo lo schema di figura 4a, lavorando a pH diversi e inducendo l'illuminazione, in modo da avere dati su ogni reazione della merocianina.

4-CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo progetto di tesi era studiare l'evoluzione della specie fotochimica "merocianina" in soluzione acquosa tramite l'utilizzo della spettroscopia Raman e la tecnica SERS. Durante l'esperienza in laboratorio è stato però riscontrato un problema nell'acquisizione di spettri risolti e utili per essere analizzati, problema individuato anche dagli altri componenti del laboratorio utilizzando la medesima soluzione madre di AuNP ottenute per ablazione in flusso.

Nonostante tutto, questo lavoro di tesi rappresenta un punto di partenza per successivi esperimenti. La tecnica Raman amplificata da superfici plasmoniche ben si presta all'obiettivo di verificare l'evoluzione strutturale inter-molecolare di una specie fotoeccitata. Il *design of experiment* presentato in questo elaborato risulta coerente e attuabile per lo scopo prefisso.

Un sentito ringraziamento va al Dott. Pezzato per la preziosa collaborazione e gli interessanti spunti di discussione.

5-BIBLIOGRAFIA

- [1]. C. Berton, D. M. Busiello, S. Zamuner, R. Scopelliti, F. Fadaei-Tirani, K. Severin, C. Pezzato, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60, 21737.
- [2]. Yi Liao. *Accounts of Chemical Research* 2017 50 (8), 1956-1964
- [3]. Zheng Shi, Ping Peng, Daniel Strohecker, and Yi Liao. *Journal of the American Chemical Society* 2011 133 (37), 14699-14703
- [4] dà "scattering" in treccani.it – Enciclopedie on line, istituto della enciclopedia italiana-consultato in data 03/11/2023
- [5] Auner, G.W., Koya, S.K., Huang, C. *et al.* Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer Metastasis Rev* 37, 691–717 (2018).
- [6] https://www.photonics.com/Articles/Raman_Spectroscopy_Identifies_Disease/a68649
- [7] le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. *Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy and related plasmonic effects.* (Elsevier, 2009).
- [8] R. Ferraro J.; Nakamoto K.; W. Brown C., *Introduction to Raman Spectroscopy*, Elsevier Science, San Diego, 1994.
- [9] Feng Tang. Micro SERS sensors based on photonic-plasmonic circuits and metallic nanoparticles. *Micro and nanotechnologies/Microelectronics.* Université de Technologie de Troyes, 2017.
- [10] https://www.metrohm.com/it_it/discover/blog/20-21/raman-vs-sers--what-s-the-difference-.html
- [11] Champion A; Kambhampati P., Surface-enhanced Raman scattering, *Chem. Society Reviews*, 1998, 27, 241-250.
- [12] Kneipp, K. *Phys. Today* 2007, 60, 40
- [13] Langer, J.; de Aberasturi, D. J.; Aizpurua, J.; Alvarez-Puebla, R. A.; Auguie, 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.; Liz-Marzán, L. M. Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* 2020, 14 (1), 28–117.
- [14] Elci, A., Demirtas, O., Ozturk, I.M. *et al.* Synthesis of tin oxide-coated gold nanostars and evaluation of their surface-enhanced Raman scattering activities. *J Mater Sci* 53, 16345–16356 (2018).
- [15] L. Litti and M. Meneghetti, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2019, 21, 15515 —15522
- [16] Chu, H.O.; Song, S.; Li, C.; Gibson, D. Surface Enhanced Raman Scattering Substrates Made by Oblique Angle Deposition: Methods and Applications. *Coatings* 2017, 7, 26.

[17] S. Ricci, M. Buonomo, S. Casalini, S. Bonacchi, M. Meneghetti, L. Litti, *Nanoscale Adv.* 2023, 5(7), 1970.

[18] Rodríguez-Hernández J.; Bormashenko E, *Breath Figures*, Springer Nature Switzerland AG, Gewerbestrasse, 2020

[19] Bormashenko E, Bormashenko Y, Frenkel M. Formation of Hierarchical Porous Films with Breath-Figures Self-Assembly Performed on Oil-Lubricated Substrates. *Materials*. 2019; 12(18):3051.

[20] R.P. Van Duyne, C.L. Haynes, in *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (Third Edition), 2003

[21] Gabriella Amberchan, A' Lester Allen, Josh H. Golden, Bakthan Singaram, and Jin Z. Zhang *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2021 9 (17), 6068-6078