



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

Substrati SERS stampati a getto d'inchiostro per
la rivelazione di cationi metallici

Relatore: Prof. Moreno Meneghetti

Controrelatore: Prof. Denis Badocco

LAUREANDO: Simonetto Fabio

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT.....	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Inquinamento da metalli pesanti.....	5
1.2 Metodi e tecniche di rilevazione ed analisi.....	9
1.3 Spettroscopia Raman.....	13
1.4 SERS: Spettroscopia Raman Amplificata da Superfici.....	20
1.5 Funzionalizzazione	29
1.5.1 1,10-fenantrolina come legante per centri metallici.....	29
1.5.2 Polimerizzazione radicalica e <i>molecularly</i> <i>imprinted polymers</i>	32
2. MATERIALI E METODI.....	37
2.1 Produzione di substrati SERS a partire da oro metallico.....	38
2.1.1 Preparazione inchiostro di nanoparticelle d'oro in soluzione acquosa.....	38
2.1.2 Stampa a getto d'inchiostro su vetrino con inchiostro a base di AuNP	40
2.1.3 <i>Dropcasting</i> di AuNP e preparazione per le misure di riferimento	40
2.2 Indagine per la dissociazione quantitativa del complesso [Fe(Phen) ₃] ²⁺ in soluzione acquosa.....	43
2.3 Funzionalizzazione dei substrati stampati con sintesi convergente.....	46

2.3.1	Funzionalizzazione delle superfici SERS con PhenNH ₂ libera (approccio 1).....	46
2.3.2	Funzionalizzazione delle superfici SERS con PhenNH ₂ pre-complessata (approccio 2).....	48
3.	RISULTATI DISCUSSIONE.....	50
3.1	Caratterizzazione dell'inchiostro di AuNP.....	50
3.2	Dropcasting e stampa inkjet printing su vetro.....	51
3.3	Spettri SERS di riferimento.....	56
3.4	Indagine per la dissociazione quantitativa del complesso [Fe(Phen) ₃] ²⁺ in soluzione acquosa.....	60
3.5	Analisi SERS dei substrati funzionalizzati.....	67
3.5.1	Substrati funzionalizzati con PhenNH ₂ libera (approccio 1).....	67
3.5.2	Substrati funzionalizzati con PhenNH ₂ pre-complessata (approccio 2).....	70
3.5.3	Analisi dei substrati 1.3 e 2.3 dopo la reazione con EDTA.....	81
4.	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....	89
5.	BIBLIOGRAFIA.....	93

ABSTRACT

I crescenti livelli di inquinamento di origine antropica nelle acque si riflette sulla presenza di metalli pesanti e sulla conseguente necessità di un monitoraggio attento, dettato da normative sempre più stringenti.

In anni recenti si stanno sviluppando nuove tecnologie in quest'ambito, per poter offrire un ventaglio di scelta più ampio e versatile. Tra queste, le metodologie basate su strumentazione portatile meritano particolare attenzione.

La spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS) è uno dei campi più promettenti per lo sviluppo di sensori atti all'analisi di campioni in matrici ambientali, in particolar modo in soluzione acquosa. La tecnica SERS, inoltre, ben si presta per lo sviluppo di sensori di dimensioni compatte, altamente selettivi verso analiti di interesse ed utilizzabili con strumentazione Raman portatile.

Durante l'internato di tesi svolto come ospite del gruppo di ricerca *Nanostructures & Optics Laboratory* del dipartimento di scienze chimiche, ho potuto lavorare al progetto che mira alla realizzazione di un sensore ottico portatile basato sulla spettroscopia Raman per l'analisi in situ di elementi metallici nelle acque.

Il lavoro oggetto del presente elaborato verte sulla produzione, funzionalizzazione e collaudo di substrati di nanoparticelle d'oro (AuNP) stampati su supporti in vetro e segue tutti gli stadi della filiera: dalla formulazione dell'inchiostro a base di AuNP utilizzato per la stampa, passando per l'ottenimento e la funzionalizzazione delle superfici fino ad arrivare ai test in soluzione e le analisi spettroscopiche.

La superficie plasmonica dei substrati è stata funzionalizzata con 5-ammino-1,10-fenantrolina (Phen-NH₂), capace di legarsi da un lato all'oro e dall'altro ai cationi, grazie alla formazione di un polimero acrilico nel cui *network* Phen-NH₂ può inserirsi. La fenantrolina, da cui la molecola utilizzata deriva, è nota per le sue proprietà complessanti e chelanti, il che la rende una specie ideale per gli scopi proposti.

1 INTRODUZIONE

1.1 Inquinamento da metalli pesanti

Nella vasta gamma di sostanze inquinanti monitorate per le diverse tipologie di acque, dai bacini superficiali all'acqua potabile, passando dai reflui industriali ed urbani, i metalli pesanti rivestono un ruolo di centrale importanza.

Convenzionalmente si indicano con questa dicitura i metalli con una densità superiore a 5 g/cm³, che comportano diverse problematiche anche a basse concentrazioni.¹ In genere i metalli pesanti sono elementi appartenenti al quarto, quinto e sesto periodo della tavola periodica. Sono dunque compresi metalli di transizione, di post transizione e semimetalli suddivisi tra il blocco *d* e *p*.

Tra i metalli più comunemente monitorati troviamo arsenico (As^{III}, As^V), cadmio (Cd^{II}), cromo (Cr^{III}, Cr^{VI}), mercurio (Hg⁰, Hg^I, Hg^{II}, CH₃Hg⁺, (CH₃)₂Hg), nichel (Ni^{II}), piombo (Pb^{II}, Pb^{IV}, Pb(C₂H₅)₄), rame (Cu^{II}), stagno (Sn^{II}, Sn^{IV}, tributilstagno-derivati) e zinco (Zn^{II}).

La presenza diffusa di alcune di queste specie in soluzione è stata largamente individuata nei decenni scorsi come causa di danni profondamente incisivi per ambiente, ecosistemi e comunità biologiche in essi comprese, non ultima, la specie umana.¹

La massiccia industrializzazione che ha accompagnato l'ultimo secolo ha portato a una crescita dei problemi di salute ecologica e pubblica associati alla contaminazione da metalli.²

Sebbene alcuni metalli di transizione come ferro, rame, zinco e siano micronutrienti essenziali per molteplici funzioni biochimiche e fisiologiche, esposizioni acute e croniche agli altri metalli sopra citati possono causare gravi effetti avversi, come lo sviluppo di malattie neurodegenerative, avvelenamento e patologie tumorali.^{2,3,4} Anche i suddetti micronutrienti, la cui assunzione a basse dosi è necessaria, risultano

dannosi se la contaminazione avviene ad alte concentrazioni. Per il rame, ad esempio, si raccomanda un livello inferiore a 2 mg/L nell'acqua potabile destinata al consumo umano⁹.

La salute degli organismi e l'equilibrio ecologico sono gravemente minacciati dall'incapacità dei metalli pesanti di degradarsi nell'ambiente. Alcuni tra questi, come il mercurio, quando presenti in quantità anomale in bacini idrici superficiali, vengono inevitabilmente assorbiti dalle creature acquatiche, animali o vegetali. La loro concentrazione può quindi facilmente aumentare di due ordini di grandezza attraverso i meccanismi di bioaccumulo e biomagnificazione, ovvero rispettivamente l'accrescimento della concentrazione nei tessuti del singolo organismo e l'amplificazione di tale fenomeno tramite la predazione lungo la catena alimentare. Questi meccanismi sono ormai noti ed estremamente dannosi per le specie che rappresentano il vertice della catena alimentare, tra cui l'essere umano, quale consumatore finale dei prodotti ittici.

Una volta che il corpo umano ne entra in contatto, la tossicità dei metalli pesanti si traduce in molteplici effetti: interagiscono con le proteine ed enzimi che non possono essere metabolizzati dall'organismo, ed, infine, causare la perdita di attività biologica dei tessuti. Inoltre, come visto, queste specie possono essere accumulate in determinati organi e causare avvelenamento.

I pazienti affetti da avvelenamento lieve possono mostrare sintomi come vertigini, debolezza degli arti e perdita di memoria. I casi gravi possono portare direttamente a difficoltà respiratorie, insufficienza renale acuta e in alcuni casi cancro.⁴⁻⁷

L'esposizione dei sistemi biologici ai metalli pesanti causa, inoltre, stress ossidativo che può danneggiare il DNA, modificare le proteine e causare perossidazione dei lipidi.

Tra i principali meccanismi associati alla tossicità dei singoli metalli in soluzione è la generazione di composti reattivi dell'ossigeno (ROS).⁸

È interessante notare come il piombo diventi tossico per gli organismi attraverso l'esaurimento degli antiossidanti mentre il cadmio genera indirettamente ROS per la sua capacità di sostituire ferro e rame.⁸

Appare evidente come sia poco sensato riferirsi alla presenza di ioni metallici in termini assoluti, al contrario è opportuno considerare i livelli di concentrazione oltre i quali una specie chimica risulta inquinante. È altresì importante distinguere tra effetti cronici, legati a tempi di esposizione prolungati e ripetuti, ed effetti acuti, relativi ad esposizioni brevi e saltuarie.

In questo senso le regolamentazioni di enti nazionali ed internazionali agiscono attraverso linee guida (OMS)⁹ e vere e proprie direttive (i.e. UE, USEPA) che stabiliscono rispettivamente i valori guida e limiti di legge entro i quali ciascuna specie metallica in soluzione deve rientrare.

In Europa sono due le direttive che riguardano la salvaguardia e il monitoraggio delle acque: la *Water Framework Directive 2000/60/EU* e la *Drinking Water 98/83/EC* che ogni stato membro deve recepire con decreti nazionali.

I suddetti valori limite normati hanno una grande variabilità, non solo tra elemento ed elemento in base al meccanismo d'azione e alla destinazione d'uso dell'acqua, ma anche tra stati di ossidazione diversi, nel caso in cui ci sia speciazione. Emblematico è il caso del cromo, per il quale in matrici ambientali, come suolo o acque sotterranee, sono previsti limiti di legge diversi per lo ione esavalente (tossico, mutageno e cancerogeno) e il cromo totale, che comprende anche il cromo trivalente, un micronutriente essenziale per molti mammiferi.¹²

Si riportano di seguito i valori guida riguardanti i metalli pesanti indicati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, nelle linee guida riguardanti l'acqua destinata al consumo umano⁹, per esposizione cronica.

Inquinante	Valore guida (mg/L)
Antimonio	0.02
Arsenico	0.01
Bario	1.3
Cadmio	0.003
Cromo totale	0.05
Mercurio	0.006
Nichel	0.07
Piombo	0.01
Rame	2

Tabella 1-Valori guida specificati dall'OMS per l'acqua destinata al consumo umano⁹

1.2 Metodi e tecniche di rilevazione ed analisi

Alla luce del potenziale pericolo rappresentato da questa classe di inquinanti, la loro rilevazione e rimozione dalle acque è stata ampiamente studiata ed approfondita.

A livello nazionale le direttive europee sopracitate, che regolamentano rigorosamente la sicurezza e la qualità delle acque, sono armonizzate alla legislazione italiana principalmente attraverso due decreti legislativi: Il D. lgs 31/2001, relativo alla qualità delle acque destinate al consumo umano, e il D. Lgs 152/2006, ovvero il testo unico ambientale, che recepiscono rispettivamente la direttiva 98/83/EC e 2000/60/EU.

Questi decreti non si limitano a sancire i valori di concentrazione massimi accettati per le sostanze inquinanti nelle diverse matrici, al contrario abbracciano tutti gli ambiti del monitoraggio, specificando, tra le altre cose, i metodi analitici di riferimento per ciascuna classe inquinante tramite i *Rapporti ISTISAN* dell'Istituto Superiore di Sanità.¹²

Tali metodi sono normati e non specificano solamente la tecnica strumentale da usarsi ma codificano tutte le fasi del processo analitico: campionamento primario e secondario, conservazione, trasporto e preparazione del campione, misura e presentazione del dato analitico con eventuale incertezza.

È necessario dunque fare un distinguo tra tecniche di analisi previste dalla norma e le tecniche alternative, che vengono utilizzate in parallelo o in sostituzione per controlli di routine o verifiche aggiuntive non obbligatorie.

Per quanto concerne la rivelazione dei metalli pesanti, i metodi indicati dai rapporti ISTISAN 19/7 sono: spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ET-AAS) e spettrometria di emissione con sorgente al plasma induttivo (ICP-OES)¹². Fa eccezione il mercurio per cui è prevista una variante dell'assorbimento atomico ovvero l'analisi dei vapori freddi.

Ci sono poi altre tecniche che vengono solitamente utilizzate perché normate da enti internazionali, o per altre varie esigenze, e possono essere divise sostanzialmente in tre categorie: spettroscopie, cromatografie e tecniche elettrochimiche^{10,11}.

La sorgente al plasma accoppiato induttivamente ed associato alla spettrometria di massa con (ICP-MS) è una tecnica molto sfruttata che permette delle analisi elementari molto accurate. Inoltre, a differenza della spettrometria di assorbimento atomico, può rivelare simultaneamente molti metalli in un ampio intervallo di massa atomica, nell'arco di pochi minuti. Quest'ultimo è il metodo normato dall'*International Organization for Standardization*.¹³

Le tecniche spettroscopiche, oltre alle già citate AAS e ICP-OES, includono la spettroscopia di emissione atomica (AES)¹³, spettroscopia atomica di fluorescenza (AFS)¹⁴ e colorimetria¹⁵.

I principali metodi cromatografici sono la cromatografia ionica (IC), la gascromatografia (GC) e cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)¹⁶

Sebbene le tecniche analitiche in questo ambito siano numerose e sofisticate, in genere richiedono strumenti costosi, ingombranti e prevedono il trasporto del campione dal sito di prelievo al laboratorio con l'implicazione di fasi aggiuntive, spesso delicate e potenzialmente compromettenti la qualità del dato analitico: la conservazione, il trasporto e la preparazione del campione.

Queste complicazioni hanno spinto negli anni lo studio di alternative portatili alla strumentazione da laboratorio, in modo da poter ottenere risultati direttamente sul campo.

La possibilità di svolgere misure *in loco*, al momento del campionamento, permette infatti di evitare una o più delle suddette fasi aggiuntive con tutti i vantaggi che ne derivano: analisi molto più veloci, con minima manipolazione del campione e la possibilità di avere una visione in tempo reale della matrice campionata, oltre ad un sensibile abbattimento dei costi, delle tempistiche e delle possibili fonti d'incertezza che ogni passaggio della procedura analitica implica inevitabilmente.

Naturalmente, la praticità della strumentazione portatile va a discapito delle prestazioni analitiche, che sono generalmente inferiori alle performance assicurate dalle tecniche di laboratorio.

La letteratura scientifica riguardante i sensori presenta molti metodi differenti per determinare la concentrazione di ioni metallici presenti in acqua, i quali possono essere suddivisi in quattro categorie: meccanici, ottici, elettrochimici, e spettrometrici.³

I metodi meccanici si basano sulla massa o sulla modifica di determinate proprietà fisiche indotta da un analita per generare un segnale correlabile alla concentrazione. Ciò può avvenire tramite l'utilizzo di materiali piezoelettrici, come nelle microbilance a cristallo di quarzo appositamente funzionalizzate, o per rigonfiamento (*swelling*) di film,⁴⁸ e consentono una configurazione molto semplice in termini di portabilità e generazione del segnale. In compenso questo approccio potrebbe avere una limitata selettività per l'analita target.

I sensori elettrochimici inducono il cambiamento di proprietà elettriche (intensità di corrente o tensione) proporzionalmente alla concentrazione di analita in soluzione. Ciò consente una quantificazione sensibile e selettiva per molti analiti in acqua, pur essendo abbastanza portatile.⁵⁰

La colorimetria è uno dei metodi analitici più usati in chimica. La principale caratteristica della colorimetria è la rilevazione dell'analita basata sul cambiamento di colore della soluzione in seguito a specifica reazione chimica.

I sensori colorimetrici rientrano nei metodi ottici e sfruttano un cambiamento nelle proprietà del sensore osservabile ad occhio nudo, indipendentemente dal fatto che si tratti di un cambiamento di colore, di fluorescenza indotta di un materiale non fluorescente, o del *quenching* della fluorescenza di un materiale naturalmente fluorescente.

La rilevazione viene eseguita in vari modi, ad occhio nudo o con appositi strumenti, come uno spettrofotometro UV/vis. La sensibilità del rilevamento può variare da una

semplice risposta qualitativa ad una risposta proporzionale ad una differenza di concentrazione.⁵¹

La concentrazione della soluzione incognita può essere determinata confrontando l'assorbanza misurata dal campione ad una specifica lunghezza d'onda con un bianco o una soluzione di controllo. Soluzioni con concentrazioni note di analita possono essere utilizzate per ottenere una retta di calibrazione che segue, ad esempio, la legge di Beer-Lambert.

Quasi tutti i chemosensori seguono lo stesso schema generale nella loro struttura molecolare: un recettore specifico per l'analita ed una porzione che genera un segnale colorimetrico.⁴⁹ Questo metodo è veloce, selettivo e può essere eseguito *in situ*. Tuttavia, la sua semplicità va evidentemente a discapito della sensibilità.

Tra i sensori ottici, i metodi spettroscopici sfruttano la risposta caratteristica di ciascuna specie chimica alla radiazione elettromagnetica per determinarne le concentrazioni. Questo metodo è altamente sensibile e selettivo ma manca della portabilità in quanto solitamente richiede una strumentazione elaborata. Nonostante questo, spettrometri e spettrofotometri compatti, adatti al trasporto e all'uso sul campo sono ormai commercializzati e diffusi.

Molta attenzione è rivolta allo sfruttamento delle proprietà uniche dei materiali su scala nanometrica per la progettazione di sensori analitici avanzati che soddisfino i requisiti di sensibilità, selettività e riproducibilità richiesti dalle misure di metalli inquinanti, oltre a poter essere implementati in dispositivi miniaturizzati ed economici per il monitoraggio in tempo reale ed *in situ*.^{52 53}

Un esempio emblematico di tecnica analitica su scala nanometrica è la spettroscopia di scattering Raman amplificato da superfici (SERS), che unisce le proprietà dei materiali nanometrici alla spettroscopia vibrazionale, nello specifico lo scattering Raman.

L'effetto Raman e la sua applicazione nella tecnica SERS sono illustrati nei seguenti capitoli.

1.3 Spettroscopia Raman

La diffusione, o *scattering*, è la deflessione in tutte le direzioni dei fotoni incidenti da parte, ad esempio, di una particella. Le onde elettromagnetiche diffuse vengono disperse radialmente nello spazio e nella maggior parte dei casi mantengono la stessa frequenza.¹⁷

Esistono tipologie differenti di diffusione, che assumono rilevanza preponderante a seconda della differenza tra le dimensioni del materiale diffusivo e la lunghezza d'onda della radiazione incidente. Tale differenza determina inoltre l'efficienza della diffusione, che è prossima allo zero per molecole in soluzione nell'intervallo del visibile ovvero nel caso in cui l'elemento dispersivo abbia dimensioni molto minori della lunghezza d'onda incidente.

In queste condizioni è predominante lo scattering di Rayleigh ovvero la diffusione elastica e descrive la quasi totalità degli eventi di diffusione.

La dicitura "scattering elastico" si riferisce al fatto che i fotoni incidenti e diffusi hanno la stessa frequenza e quindi la stessa energia.

Approssimativamente, un fotone ogni dieci milioni¹⁷ non conserva l'energia precedente all'evento di scattering. Questi casi, molto meno probabili rispetto allo scattering elastico Rayleigh, costituiscono la diffusione anelastica, chiamata effetto Raman in onore di Chandrasekhara Venkata Raman, premio Nobel per la fisica nel 1930, che lo scoprì.

Lo scattering Raman presenta quindi lievi differenze in energia rispetto allo scattering Rayleigh, e fornisce informazioni sulla sua struttura e su come essa interagisce con le specie circostanti. Per descrivere l'effetto Raman si può utilizzare la teoria elettromagnetica classica per un sistema molecolare in fase gassosa, trascurando le interazioni intermolecolari.

Un campo elettromagnetico monocromatico $\vec{E}(t)$, oscillante nel tempo t , alla frequenza ω_L , è definito, considerando solamente la componente di campo elettrico, come in Equazione 1

$$\vec{E}(t) = E \cos(\omega_L t) \quad \text{Equazione 1}$$

La perturbazione di una molecola da parte di un campo elettromagnetico può essere valutata come l'influenza che esso causa alla distribuzione elettronica molecolare. Un dipolo elettrico indotto $\vec{\mu}_{ind}(t)$ è quindi definito dall'interazione del campo $\vec{E}(t)$ con la polarizzabilità molecolare $\alpha(\omega)$:

$$\vec{\mu}_{ind}(t) = \alpha(\omega_L) \vec{E}(t) \quad \text{Equazione 2}$$

È necessario inoltre considerare la dipendenza della polarizzabilità α dal tempo, poiché la distribuzione elettronica molecolare dipende dalla posizione degli atomi, che non sono fissi nelle posizioni di equilibrio. In particolare, la polarizzabilità può essere vista come un'espansione in serie dipendente dal tempo (troncata al secondo termine in Equazione 3):

$$\alpha(t) = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_0 Q_{0,i} \cos(\omega_i t) \quad \text{Equazione 3}$$

dove il pedice **0** indica il valore nelle posizioni di equilibrio e $Q_{0,i}$ indica la coordinata dell'*i*-esimo modo normale di vibrazione.⁵⁸

Ai fini di una trattazione classica, un modo normale consiste in un moto vibrazionale che coinvolge tutti gli atomi di una molecola che si muovono contestualmente e con la stessa frequenza.

Sostituendo l'Eq.1 e l'Eq.3 nell'Eq.2 si ottiene la seguente espressione:

$$\bar{\mu}_{ind}(t) = \alpha_0 \bar{E}_0 \cos(\omega_L t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_0 Q_{0,i} \bar{E}_0 \cdot \{ \cos[(\omega_L - \omega_i)t] + [\cos(\omega_L + \omega_i)t] \}$$

Equazione 4

La porzione evidenziata in verde, si riferisce allo scattering Rayleigh, in cui la frequenza di oscillazione non viene modificata dall'interazione con l'elemento diffusivo e si verifica quando una molecola nel suo stato elettronico fondamentale di energia E_0 , interagisce con un fotone con frequenza angolare ω_L e raggiunge uno stato virtuale di energia $\hbar\omega_L$, dove \hbar è la costante di Planck divisa per 2π , e diffonde istantaneamente un fotone di frequenza angolare ω_S uguale a ω_L .

Ora consideriamo gli altri due termini dell'Eq. 4: come si evince dall'espressione, il dipolo elettrico indotto $\bar{\mu}_{ind}(t)$ oscilla anche ad altre due frequenze che danno luogo allo scattering anelastico della luce, lo scattering Raman.

L'espressione in rosso indica che il dipolo oscilla ad una frequenza angolare $\omega_S = \omega_L - \omega_m$ e numero d'onda $\tilde{\nu}_S = \tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_m$ dove ω_m e $\tilde{\nu}_m$ sono legati all'energia caratteristica dello stato vibrazionale responsabile dello scattering Raman.⁵⁸

Questa oscillazione dà origine al *segnale Stokes*: la molecola che interagisce con la radiazione può trovarsi nel suo stato vibrazionale fondamentale dello stato elettronico non eccitato, quindi, dopo aver raggiunto lo stato virtuale, si rilassa verso uno degli stati vibrazionali eccitati dello stato elettronico fondamentale, emettendo quindi un fotone di frequenza angolare inferiore della radiazione incidente.

La porzione blu dell'Eq 4, invece, descrive il *segnale anti-Stokes*, caratterizzato da frequenza angolare di $\omega_S = \omega_L + \omega_m$ e numero d'onda $\tilde{\nu}_S = \tilde{\nu}_L + \tilde{\nu}_m$ (figura 1): nel caso in cui l'eccitazione si origini da uno stato vibrazionale eccitato e si rilassi allo stato vibrazionale fondamentale, diffondendo un fotone di frequenza angolare maggiore di ω_L . I processi appena descritti sono illustrati in figura 1.

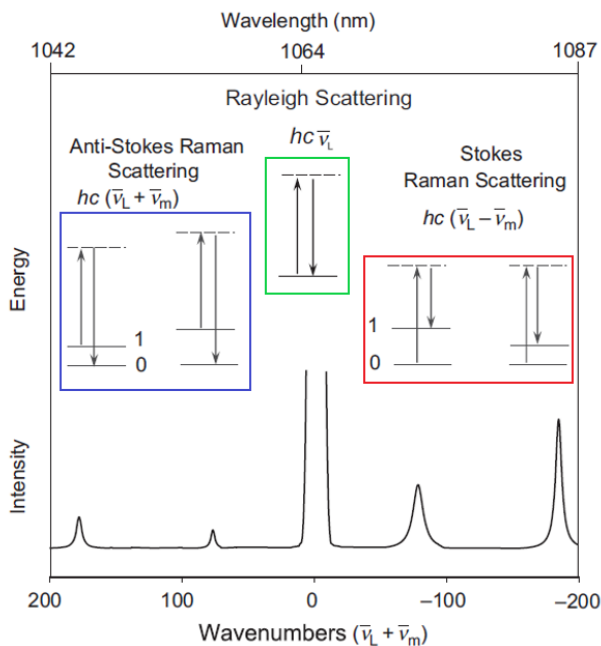


Figura 1-Schema riassuntivo dei processi di scattering possibili¹⁸

Gli spettri Raman sono quindi riportati in Raman shift (cm^{-1}), definito come la differenza tra il numero d'onda della luce incidente $\tilde{\nu}_L$ e quello di quella diffusa $\tilde{\nu}_m$, e si indica con il simbolo $\Delta\tilde{\nu}=\tilde{\nu}_L+\tilde{\nu}_m$.⁵⁹ Ciò è particolarmente utile, perché rende il segnale indipendente dalla frequenza del fotone incidente, dato che lo scattering Raman può essere ottenuto, ad esempio, lungo tutto l'intervallo del visibile.

Sempre dall'equazione 4 si possono ricavare le regole di selezione per la spettroscopia Raman. Infatti, il secondo termine in Eq. 4 è diverso da zero se $(\frac{\partial\alpha}{\partial Q_i})_0 \neq 0$, quindi se una variazione di polarizzabilità rispetto alla coordinata vibrazionale normale i nella posizione di equilibrio è diversa da zero.

A differenza della spettroscopia IR, che si basa sulle variazioni dei momenti di dipolo della molecola indotte dalle vibrazioni IR-attive, la spettroscopia Raman si basa sulle variazioni della polarizzabilità dei legami lungo la coordinata di vibrazione dei modi Raman-attivi, ovvero la deformazione della "nube" elettronica della molecola.

Questa importante differenza porta le due spettroscopie vibrazionali, ad essere in certa misura complementari e, in quanto tali, entrambe necessarie per indagare in modo esaustivo i modi vibrazionali di molecole e materiali.

Specie chimiche contenenti legami omonucleari, come i legami C-C, C=C, S-S, subiscono una variazione della polarizzabilità, sono perciò esempi di legami che generano bande spettrali Raman-attive ma che sarebbero invisibili o difficili da vedere con la spettroscopia vibrazionale nell'infrarosso, per via della loro simmetria.¹⁸

La complementarità delle tecniche assume particolare rilevanza nei casi in cui la simmetria del sistema prevede un centro di inversione (comunemente indicato con la lettera *i*), ovvero in tutte le molecole centrosimmetriche, poiché l'attività dei loro modi normali di vibrazione è mutualmente esclusiva¹⁷: se un segnale appare nello spettro Raman non sarà presente nel corrispondente spettro IR e viceversa.

Si evince dunque che lo scattering Raman è più adatto a rivelare modi di vibrazione simmetrici di gruppi non polari, mentre uno spettro IR evidenzia vibrazioni asimmetriche di legami polarizzati¹⁸.

L'espressione 5 esplicita la dipendenza dell'intensità del segnale Raman (I_R) da altre variabili sperimentali, quali l'intensità della luce incidente (I_0), il numero di molecole che diffondono (N), la frequenza (ν) e la derivata parziale della polarizzabilità α rispetto all'ampiezza della vibrazione Q .¹⁸

$$I_R \propto \nu^4 I_0 N \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2$$

Equazione 5- Espressione della dipendenza dell'intensità del segnale Raman dall'intensità della luce incidente I_0

Ricordando la probabilità molto bassa di un evento di scattering anelastico (*i.e.* Raman), in relazione alla diffusione di Rayleigh, ne consegue una bassa intensità generale dei segnali spettrali Raman, il che rende la tecnica meno sensibile di altre tecniche spettroscopiche.

Per questo motivo si è osservato in interesse crescente verso lo scattering Raman solo in seguito alla diffusione e al perfezionamento delle sorgenti laser.

Lo sviluppo della tecnologia *laser*, acronimo di *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, sorgenti di radiazione monocromatica con coerenza molto elevata e capaci raggiungere valori di irradianza inediti, ha aperto la strada alla spettroscopia Raman come tecnica di analisi.

Grazie all'utilizzo dei laser, infatti, l'intensità della radiazione incidente sul campione, e di conseguenza della porzione diffusa, ha reso possibile ovviare, in molti casi, alle limitazioni d'uso imposte dalla bassa sensibilità della tecnica. In aggiunta, la monocromaticità di queste sorgenti si rivela cruciale per la spettroscopia Raman, poiché essa si basa sull'osservazione di shift di frequenze molto ridotti in rapporto alla frequenza della radiazione eccitatrice.

L'applicazione dei laser ha di fatto sdoganato la spettroscopia Raman, negli ultimi decenni le applicazioni legate a questa tecnica si sono infatti moltiplicate, di pari passo al crescente sviluppo tecnologico della strumentazione.

La continua ricerca nell'amplificazione del segnale Raman ha portato allo sviluppo di numerose implementazioni, tra cui lo scattering Raman risonante (RR), che sfrutta appunto la risonanza tra il laser eccitatore e le transizioni elettroniche dell'analita per incrementare l'intensità dei segnali.

Ricordando che nella diffusione anelastica gli stati intermedi virtuali non rappresentano uno stato energetico ben definito del sistema, quando la frequenza dell'onda elettromagnetica incidente si avvicina all'energia delle transizioni tra i livelli elettronici, l'entità dell'effetto Raman aumenta a causa degli effetti di risonanza. Se lo stato intermedio corrisponde a uno stato elettronico discreto, l'interazione è descritta come scattering Raman risonante e l'intensità del segnale supera quella del corrispondente scattering non risonante di diversi ordini di grandezza.¹⁹

Tale tecnica risulta però problematica nel momento in cui la molecola target del processo di scattering sia anche fluorescente. In questo caso il processo di fluorescenza sarebbe preponderante e se si andasse ad irradiare il campione con una

sorgente laser con lunghezza d'onda vicina a quella caratteristica della transizione elettronica in questione, l'emissione di fluorescenza andrebbe ad oscurare completamente il segnale Raman.

Nella vasta gamma delle varianti nelle quali si declina la spettroscopia Raman, un ruolo di rilievo lo riveste indubbiamente la spettroscopia Raman amplificata da superfici, nota con l'acronimo SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*).

Questa tecnica mira ad accrescere il segnale Raman sfruttando le delle superfici metalliche nanostrutturate, e riveste un ruolo centrale nel lavoro descritto nel presente elaborato.

I principi ed il funzionamento del SERS verranno spiegati nel capitolo successivo.

1.4 SERS: Spettroscopia Raman amplificata da superfici

La spettroscopia Raman amplificata da superfici sfrutta la presenza di una fase solida, o colloidale, con caratteristiche peculiari e specifiche che rendono possibile un netto incremento dei segnali tipici dello scattering Raman.

I processi che rendono possibile l'esplicazione dell'effetto SERS sono due: il meccanismo chimico (chemical enhancement, CE) ed il meccanismo di campo elettromagnetico (electromagnetic enhancement, EM).

Amplificazione chimica (CE)

Il meccanismo chimico consiste in una combinazione di effetti che riguardano la superficie e la molecola.⁵⁸ Il primo requisito, generale, è che la molecola deve essere molto vicina al substrato SERS, fino a pochi nanometri.⁶²

In generale, il CE prevede una variazione della distribuzione elettronica della molecola causata dall'interazione con la superficie del substrato (spesso metallico). Di conseguenza verrà influenzato il suo tensore di polarizzabilità e quindi la sezione d'urto Raman che ne consegue. L'entità della perturbazione dipende dalla disponibilità di transizioni elettroniche e l'interazione attraverso la sovrapposizione degli orbitali molecolari⁵⁸.

Nel meccanismo di trasferimento di carica, anch'esso riconducibile al CE, la molecola si lega alla superficie del metallo per formare un complesso.

Questo fenomeno viene descritto come una eccitazione che ha luogo sul metallo, che viene quindi trasferita alla molecola da cui avviene il processo Raman, prima di essere infine emessa come scattering dal substrato.⁶³ Inoltre, quando la differenza tra il livello di Fermi del metallo e il livello HOMO o LUMO della molecola corrisponde all'energia del laser, si identifica un trasferimento di carica chiamato foto-guidato⁵⁸. Questo è stato osservato e verificato durante un esperimento elettrochimico in cui la differenza di energia tra la molecola adsorbita e il metallo è stata regolata attraverso l'applicazione di un potenziale esterno.

In conclusione, le regole di selezione SERS possono essere ricavate dagli studi del meccanismo di amplificazione chimica. Esse indicano che i modi vibrazionali che vengono maggiormente potenziati sono quelli che presentano un dipolo di transizione perpendicolare rispetto alla superficie plasmonica.⁶⁴

Amplificazione di campo elettromagnetico (EM)

Il meccanismo di campo elettromagnetico è più generale ed indipendente dalla natura chimica dell'analita. Questo può incrementare la generazione di segnale Raman di un fattore compreso tra 10^8 a 10^{11} . In un comune esperimento SERS, dove avvengono simultaneamente sia il CE che il EM, quest'ultimo è di gran lunga l'effetto preponderante.²⁰

Il principio che sta alla base del meccanismo elettromagnetico è la generazione di plasmoni superficiali localizzati, indotti dall'interazione tra il metallo nanostrutturato e la radiazione elettromagnetica all'interfaccia con un materiale dielettrico.

I plasmoni sono oscillazioni coerenti degli elettroni di conduzione attorno alla posizione di equilibrio, indotte dalle onde elettromagnetiche incidenti, che si propagano in direzione parallela all'interfaccia. La porzione di volume di carica opposta che ne consegue, agisce da forza di ritorno per gli elettroni.

Il sistema risultante può essere descritto con l'approssimazione dell'oscillatore armonico smorzato, in cui le oscillazioni di carica hanno una loro relativa frequenza di risonanza.

I plasmoni di superficie possono essere propagati o localizzati.⁵⁸

Il primo caso caratterizza le superfici macroscopiche, dove l'oscillazione di carica transiente si propaga al confine tra metallo e dielettrico dando origine a un fenomeno confinato in due dimensioni.

Il secondo caso riguarda i materiali metallici nanostrutturati come nanoparticelle o superfici ruvide: l'oscillazione collettiva degli elettroni è confinata alla superficie in una regione limitata e molto ridotta rispetto alla lunghezza d'onda del laser incidente.

La frequenza precisa in grado di eccitare un plasmone localizzato dipende dal metallo e dalla forma della particella/superficie ed è indicata come risonanza plasmonica localizzata di superficie (LSPR).¹⁹

La lunghezza d'onda della LSPR dipende quindi da diversi fattori: le dimensioni, la forma, il materiale e le proprietà dielettriche delle nanoparticelle, nonché il loro grado di aggregazione e l'indice di rifrazione dell'ambiente circostante.

Per descrivere analiticamente un LSPR, consideriamo una nanoparticella metallica, approssimativamente sferica (NP), di raggio r , ed assumiamo il rapporto $\frac{r}{\lambda} < 0,1$ per poter considerare un regime quasi statico e un campo elettromagnetico uniforme intorno alla NP, dove λ è la lunghezza d'onda incidente. La particella è quindi immersa in un campo elettrico oscillante e , date le condizioni di $\frac{r}{\lambda}$, costante. Si sviluppano quindi dipoli elettrici oscillanti che, secondo la descrizione classica, sono localizzati sulla superficie della nanoparticella.

Una molecola situata a una distanza d dalla superficie metallica di una sfera di raggio r sarà influenzata da un campo locale \bar{E}_{SP} , espresso nell'equazione 6⁶¹:

$$\bar{E}_{SP} = \frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0} \bar{E}_0 \left(\frac{r}{r+d} \right)^3$$

Equazione 6

Dove \bar{E}_0 è il campo elettrico della radiazione incidente, ε è la permittività elettrica delle nanoparticelle metalliche e ε_0 è la permittività elettrica dell'ambiente esterno. Il meccanismo EM viene definito *near-field*, poiché, come suggerisce l'espressione, decade esponenzialmente all'aumentare della distanza dell'analita dalla superficie del substrato. Si rende perciò necessario il controllo dell'interazione analita-substrato, spesso per niente banale. Il massimo E_{sp} si verifica quando il denominatore si avvicina a zero, ovvero quando $\varepsilon \approx -2\varepsilon_0$. Questa condizione viene soddisfatta eccitando la LSPR, che cade nel range della luce visibile per nanostrutture di oro e argento. Questi ultimi risultano dunque i principali metalli sfruttati per applicazioni

SERS.⁵⁸ Infine, si può dimostrare che il fattore di amplificazione SERS (chiamato Enhancement Factor, EF), per il contributo EM, è ben approssimato dalla quarta potenza del campo locale $\overline{E}SP$.^{58 61}

L'effetto di amplificazione indotto dai campi elettrici indotti sulla superficie dei substrati SERS grazie ai LSP può risultare ulteriormente incrementato grazie ai cosiddetti *hot-spot*. Il termine "hot-spot" definisce delle zone del substrato nelle quali i campi indotti possano concentrarsi per effetti di interferenza o di curvatura: ne sono un esempio gli interstizi tra due nanoparticelle aggregate (Figura 2) o le protuberanze e gli spigoli nel caso di particelle anisotrope.^{19,66}

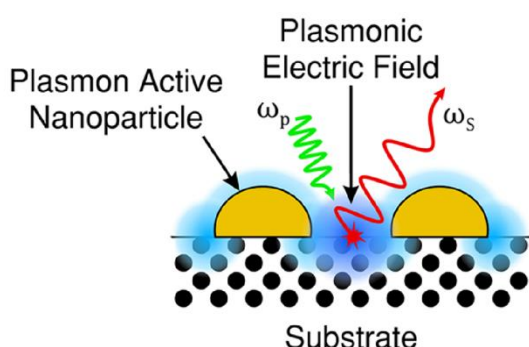


Figura 2-Rappresentazione del processo di scattering Raman amplificato dall'effetto elettromagnetico near-field. In evidenza il sito interstiziale tra due nanoparticelle plasmoniche.¹⁹

L'effetto di amplificazione del campo in prossimità del substrato sta alla base della tecnica SERS.¹⁹

Tipologie di substrati SERS

Gli studi della tecnica SERS negli anni hanno portato allo sviluppo di numerosi substrati, i quali possono essere divisi in due macrogruppi: nanostrutture metalliche fabbricate su un substrato solido e sospensioni colloidali di nanoparticelle plasmoniche.

Particelle sferiche colloidali, sintetizzate tramite metodi di *wet-chemistry*, sono in genere substrati a basso costo che possono essere facilmente prodotto in quantità massicce. Tuttavia, nanoparticelle sferoidali e isolate non forniscono un sufficiente Enhancement Factor per essere utilizzate in modo efficace. Pertanto, sono state

ideate soluzioni per sopperire al problema tramite l'ottenimento di strutture più sofisticate.²¹ Esempi di questo tipo sono:

- particelle colloidali singole anisotrope²²
- assemblaggi ordinati di nanoparticelle stabili in soluzione²³
- assemblaggi di nanoparticelle su superfici solide inerti²⁴
- superfici bidimensionali e tridimensionali tramite assemblaggio colloidale²⁵
- nanolitografia.²⁶

A prescindere dalla categoria di substrato plasmonico, solitamente la produzione dei suddetti si svolge in una delle due modalità comuni a tutti i processi, dette *bottom-up* e *top-down*.

I metodi *bottom-up* prevedono, generalmente, la riduzione di sali di metalli nobili, quali oro o argento, in soluzione acquosa. Successivamente si attuano diverse tecniche per ottenere la coagulazione in particelle colloidali dei metalli puri dalle dimensioni di decine o centinaia di nanometri. L'utilizzo di agenti capping è il più comune a tale scopo, fermando la crescita delle nanoparticelle a dimensioni predefinite. Tali particelle possono essere singole o creare aggregati, a seconda della natura delle stesse e dalle caratteristiche chimiche della soluzione in cui si trovano. Particolare rilevanza ai fini della stabilità e dello stato di aggregazione della soluzione colloidale assume il pH, la forza ionica, la temperatura e la presenza di agenti stabilizzanti.²⁰

Al contrario, l'approccio *top-down* prevede l'ottenimento di nanostrutture a partire dal target metallico, un corpo dunque macroscopico che viene intaccato, ad esempio, da un laser pulsato ad alta intensità, o da un fascio elettronico, nella litografia a fascio di elettroni.¹⁹

Riguardo al primo gruppo di nanostrutture, ovvero le particelle colloidali singole anisotrope, sono frequenti substrati caratterizzati da *nanorods*, *nanostars* o nanocubi di materiale metallico, utili grazie alle anisotropie che li caratterizzano (confronto in *figura 5*)

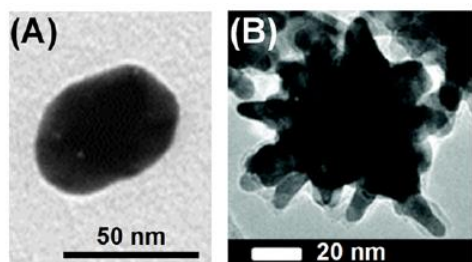


Figura 3- Esempi di immagini TEM di nanoparticelle sferiche (A) e nanostar (B).²¹

Sebbene i substrati per la rivelazione di analiti che si basano su nanoparticelle colloidali, comprese le strutture anisotrope, beneficino della relativa semplicità della loro fabbricazione, la loro diretta applicabilità *in loco* in strumenti analitici ultrasensibili e quantitativi può essere problematica. Infatti, la stabilità colloidale in mezzi complessi con elevata forza ionica e la presenza di materia organica in concentrazioni non trascurabili possono influenzare gravemente la riproducibilità del segnale. Inoltre, un sistema di misura basato su una soluzione colloidale renderebbe molto difficile il riutilizzo per misure successive, il che costituisce uno svantaggio pratico ed economico. Le suddette limitazioni possono essere aggirate organizzando le nanostrutture in configurazioni fisse su supporti solidi.

La deposizione su superfici inerti con conseguente assemblaggio e la nanolitografia sono le principali metodologie sfruttate per l'ottenimento di questa seconda tipologia di substrati.²¹

In *figura 4* vengono riportate le immagini SEM (microscopio elettronico a scansione) di due sistemi ordinati appartenenti a questa tipologia di nanostrutture. In entrambi i casi presentano *nanorods*, barre nanoscopiche di argento (A) ed oro (B), i metalli nobili privilegiati per queste applicazioni in quanto, come segnalato nel precedentemente, risultano i più efficienti per la risonanza plasmonica di superficie nell'intervallo del visibile. In aggiunta, specialmente i materiali aurei, hanno il vantaggio di resistere all'ossidazione ed evitano reazioni indesiderate, grazie alla ben nota stabilità ed inerzia chimica.

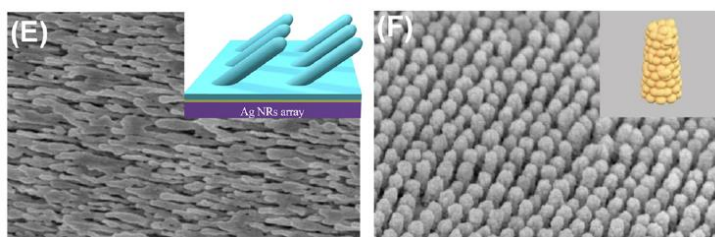


Figura 4-Immagine SEM di nanostrutture su supporto solido. (A) Nanorod di argento ottenuti con deposizione ad angolo obliquo. (B) Nanorod d'oro da reactive ion etching, incisione con flusso ionico e successiva polverizzazione catodica.²¹

Degna di nota è sicuramente l'*inkjet printing*, tecnica per la preparazione di substrati basata sulla stampa a getto d'inchiostro su supporti inerti da parte di apposite stampanti 2D il cui inchiostro è costituito da soluzioni colloidali di nanoparticelle in acqua o altri solventi.

In questa direzione è rivolto lo studio e lo sviluppo del sensore a cui questo elaborato fa riferimento e che verrà illustrato nei capitoli successivi.

Stato dell'arte dei sensori SERS per la rivelazione di metalli pesanti

La rivelazione SERS dei metalli pesanti nelle acque è un campo di ricerca nato da circa quindici anni ma che nonostante la relativa novità, si è espanso esponenzialmente.²¹ Tale crescita è dovuta ai progressi delle tecniche di nanofabbricazione, nonché sulla progettazione di ligandi molecolari e recettori che stanno progressivamente promuovendo la transizione da studi di base su semplici matrici artificiali alla quantificazione sul campo di metalli attraverso dispositivi ottici portatili e multifunzionali.²¹

Come marcatore per il rilevamento SERS, le molecole Raman utilizzate più di frequente sono suddivise in due categorie: la prima è costituita da molecole con gruppi funzionali -SH o -NH₂, come il 4-aminotiofenolo (4-ATP), acido 4-mercaptobenzoico (4-MBA), 1,10-fenantrolina (Phen) e la 4-mercaptopiridina (4-MPy), che possiedono una forte affinità per gli ioni metallici attraverso la formazione di legami. La seconda categoria è rappresentata da molecole di coloranti con carica

netta come la rodamina 6G (R6G), la rodamina B (RB) e il verde malachite (MG), che si combinano con i substrati metallici per interazione elettrostatica.

In letteratura scientifica sono presenti diverse review riguardanti sensori SERS atti all'analisi di ioni metallici, come il recente lavoro di Guanga Xu e collaboratori¹, che raccoglie le applicazioni SERS su diverse matrici, o la review firmata da Guerrini e Alvarez-Puebla²¹ che illustra le ultime novità di questa tecnologia specificatamente per il rilevamento di metalli nelle acque.

Molti dei sistemi ivi descritti si servono di biomolecole come i nucleotidi per il sequestro selettivo degli ioni e il collegamento con la superficie plasmonica.

Ne è un esempio il sistema sviluppato per lo ione Hg^{2+} studiato da molti gruppi di ricerca tra i quali Kuang e collaboratori⁵⁴ che si basa sull'assemblaggio del complesso timina- Hg^{2+} -timina di due filamenti complementari di DNA. Quest'ultimo meccanismo molecolare, in questo specifico caso permette di tradurre il l'accoppiamento dei due filamenti indotto dalla presenza del metallo in una modifica nello spettro Raman proporzionale alla concentrazione dello stesso. Grazie all'avvicinamento provocato dalla coordinazione dello ione mercurio, viene indotta la dimerizzazione di due nanostar d'oro funzionalizzate con 4-ATP con il conseguente aumento di hot-spot e di segnale.

In generale si delineano quattro grandi classi di sensori, in base al meccanismo di azione:

- *direct sensing*,
- *indirect sensing* tramite l'aggregazione di nanoparticelle,
- *indirect sensing* per variazione conformazionale dei recettori molecolari
- *indirect chemosensing* con reazione diretta tra la specie target e il recettore SERS-attivo.

Le performance analitiche che questi sensori possono assicurare, considerando i limiti massimi consentiti e le concentrazioni abituali di questi inquinanti in contesti reali, sono abbondantemente adatte allo scopo: i limiti di rivelabilità sono, a seconda del caso, tra 10 nM e 100 pM, con intervalli di linearità fino a cinque ordini di grandezza.²¹

Mentre i vantaggi e gli svantaggi di ciascun approccio sono molto specifici, si possono trarre alcune considerazioni generali. Innanzitutto, gli approcci di rilevamento diretto richiedono solitamente, oltre a un'affinità intrinseca della specie bersaglio per la superficie metallica, la separazione dell'analita da mezzi complessi. Questo impedisce in larga misura l'applicabilità di tali metodi per il rilevamento SERS in situ delle specie di metalli nelle acque naturali.

Il substrato al centro del nostro lavoro si pone nella classe dei dispositivi *indirect sensing* con reazione tra target e recettore.

Nello specifico è stata utilizzata la 5-ammino-1,10-fenantrolina (Phen-NH₂), derivato amminico della Phen, come molecola legante per i centri metallici e al contempo marker SERS.

La funzionalizzazione, oggetto del capitolo seguente, è pensata per superare le limitazioni del rilevamento diretto ed essendo legata chimicamente al substrato stampato mediante inkjet printing, presenta le caratteristiche per sopperire alla scarsa riproducibilità e scalabilità di soluzioni analoghe

1.5 Funzionalizzazione

1.5.1 1,10-fenantrolina come legante per centri metallici

Quanto affermato finora riguardo alla spettroscopia Raman e alla SERS si applica a specie molecolari: lo sviluppo di un sistema di misura volto a rivelare basse concentrazioni di analita che si basi sull'effetto Raman necessita di un target che preveda transizioni vibrazionali e, dunque, almeno un legame intramolecolare. Questa prerogativa, non contemplata per altre tecniche analitiche, pone un livello di complicazione ulteriore nel momento in cui le sostanze da rivelare sono metalli pesanti, che in soluzione acquosa sono talvolta specie monoatomiche solvate, prive dunque di legami covalenti che possano essere coinvolti in transizioni vibrazionali. Inoltre, in misure di spettroscopia Raman l'acqua è sostanzialmente invisibile e questo aspetto peculiare, solitamente vantaggioso, rimarca ulteriormente il problema.

Al fine di rendere visibili questa categoria di inquinanti agli occhi della spettroscopia Raman esistono numerose soluzioni, che si dividono in rivelazioni dirette o indirette (*direct sensing* e *indirect sensing*), come sopra citato.²¹

Il *direct sensing* è l'approccio più semplice, ovvero la rivelazione immediata dell'analita di interesse senza l'intermediazione di altre specie molecolari.

Per caratteristiche intrinseche, nell'ambito dell'inquinamento da metalli pesanti, solo i centri metallici coinvolti in composti inorganici e metallorganici rientrano nel target di quest'ambito, ne sono un esempio le diverse forme in cui è presente l'arsenico, presente spesso in composti metallorganici e in forma inorganica in arseniti (AsO_3^{3-}) o arseniati (AsO_4^{3-}) rispettivamente in stato di ossidazione tre e cinque.

Un'applicazione SERS nella misura diretta di questo semimetallo è stata possibile grazie alla separazione fisica delle due specie inorganiche sopracitate sfruttando

l'effetto *coffee ring* conseguente all'evaporazione di una soluzione dei due ioni in soluzione acquosa su una superficie di nanoparticelle di argento.²²

L'approccio *indirect sensing*, notevolmente più sfruttato in quest'ambito, necessita come detto della formazione di legami tra l'analita e il sistema SERS. Una via sicuramente efficace è la complessazione degli ioni tramite molecole leganti. La formazione di complessi metallici è stata ed è ampiamente sfruttata nella chimica analitica e rappresenta un campo estremamente vasto.

I leganti molecolari possono appartenere alle classi chimiche più diverse, sia organiche che inorganiche e sono generalmente suddivisi in base alla carica elettrica (anionici, cationici o neutri), al numero di siti di legame (leganti monodentati, bidentati, multidentati), alla geometria di coordinazione (chelanti, macrociclici), alla presenza di atomi donatori differenti nello stesso legante (ambidentati).

In quest'ottica si inserisce la 1,10-fenantrolina, un classico ligando neutro, bidentato, chelante che coordina gli ioni dei metalli di transizione tramite i due atomi di azoto. La fenantrolina (phen) è un composto organico eteroaromatico che ha rivestito un ruolo importante nello sviluppo della chimica di coordinazione e continua ancora essere di notevole interesse come materiale di partenza versatile per la chimica organica, inorganica e supramolecolare. È sistema planare, idrofobico allo stato neutro, povero di elettroni in cui gli atomi di azoto sono ben posizionati per agire in modo cooperativo verso un'ipotetica coordinazione con un centro metallico. Queste caratteristiche strutturali determinano la sua capacità di coordinare molto efficacemente gli ioni metallici.

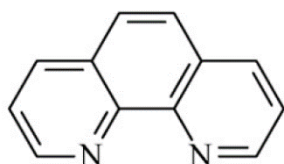


Figura 5-struttura della 1,10-fenantrolina

Il complesso della 1,10-fenantrolina con lo ione ferro divalente (ferroina) presenta tre molecole di legante coordinate al metallo con geometria ottaedrica (figura 5), è

termodinamicamente stabile e la cinetica favorevole permette una formazione pressoché immediata ed un viraggio della soluzione verso una colorazione rosso vivo.

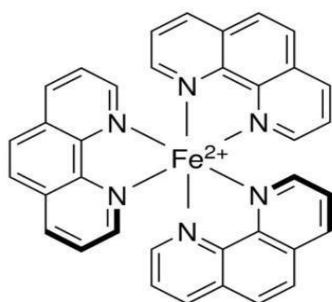


Figura 6-struttura della ferrioxalato, complesso ottaedrico in cui tre molecole di fenantrolina coordinano lo ione Fe(II).

Di seguito viene riportata una tabella con le costanti termodinamiche di formazione per i complessi della 1,10-fenantrolina con altri ioni metallici.

Come si evince dalla tabella, le costanti di stabilità dei complessi con alcuni pericolosi inquinanti (cadmio, cobalto, mercurio, nichel) sono molto più alte di quelle dei complessi con Na, K, Ca, la cui abbondanza naturale è così elevata da renderli i principali interferenti.

Centro metallico	Complesso	log β
Bi(II)	[Bi(phen) ₂] ²⁺	6.93 ²⁸
Ca(II)	[Ca(phen)] ²⁺	5.94±0.05 ²⁹
Cd(II)	[Cd(phen) ₃] ²⁺	15.2 ³⁰ 15.8 ³¹ 14.26 ³¹
Co(II)	[Co(phen) ₃] ²⁺	20.1 ³² 19.77 ³¹ 20.10 ³¹
Cu(I)	[Cu(phen) ₂] ⁺	11.3±0.6 ³³
Cu(II)	[Cu(phen) ₂] ²⁺	18 ³⁰ 20.9 ³² 18.6 ³⁴ 20.48 ³⁵
Cr(II)	[Cr(phen) ₃] ²⁺	5.85 ³⁶
Fe(II)	[Fe(phen) ₃] ²⁺	21.5 ^{30 31} 21.3 ³⁷ 21.18 ³⁸
Fe(III)	[Fe(phen) ₃] ³⁺	14.5 ³⁰ 15 ³⁹ 14.1 ⁴⁰
Hg(II)	HgCl ₂ (phen) ₂	19.65 ^{41 42}
K(I)	[K(phen) ₂] ⁺	4.93±0.01 ⁴³ 5.04±0.01 ⁴³
La(III)	[La(phen)] ³⁺	8.47±0.03 ⁴⁴

Li(I)	[Li(phen) ₂] ⁺	5.37±0.09 ⁴³ 6.18 ⁴³
Mn(II)	[Mn(phen)] ²⁺	7.36 ³¹ 9.75 ³¹ 10.40 ³¹
Mo(VI)	[Mo(phen) ₂] ⁶⁺	11.76 ⁴⁵
Na(I)	[Na(phen) ₂] ⁺	5.40±0.09 ⁴³ 5.83 ⁴³
Ni(II)	[Ni(phen) ₃] ²⁺	18.3 ⁴⁶ 23.9 ³² 24.15 ³⁴ 24.3 ³¹ 24.8 ³¹
Pb(II)	[Pb(phen) ₂] ²⁺	6.41 ²⁸
Sc(III)	[Sc(phen)] ³⁺	10.83±0.02 ⁴⁴
Y(III)	[Y(phen)] ³⁺	9.47 ±0.04 ⁴⁴
V(II)	[VO(phen) ₂ (ClO ₄)] ⁺	5.95 ⁴⁷
Zn(II)	[Zn(phen) ₃] ²⁺	17 ^{30 32} 17.2 ³¹

Tabella 2- elenco dei principali complessi formati dalla fenantrolina con i metalli di transizione, e relative costanti termodinamiche di complessamento.

La spiccata capacità della 1,10-fenantrolina nella formazione di complessi molto stabili con numerosi centri metallici, unita al fatto di essere Raman-attiva, rende questa molecola il target ideale per esperimenti SERS volti alla rivelazione di ioni metallici in campioni d'acqua.

1.5.2

Polimerizzazione radicalica e *molecularly imprinted polymers*

La polimerizzazione radicalica, così come le polimerizzazioni a catena, porta alla formazione di polimeri mediante conversione di doppi legami presenti nell'unità monomerica in legami saturi. Generalmente la polimerizzazione è condotta in presenza di un iniziatore.

Con il termine iniziatore di polimerizzazione, si intende un composto capace di fornire, in particolari condizioni di polimerizzazione, delle specie reattive, i radicali liberi in grado di addizionarsi ad una molecola di monomero attraverso la rottura del legame π e con la contemporanea formazione di un altro radicale (reazione di iniziazione).

Attraverso l'addizione successiva di altre unità monomeriche a tale centro attivo viene a formarsi una catena polimerica (reazione di propagazione) la cui crescita è interrotta quando il centro attivo formatosi viene disattivato a causa di reazioni diverse che risultano funzione, oltre che della natura del centro attivo, delle particolari condizioni di reazione (reazione di terminazione).

L'anidride poliacrilica, polimero dell'anidride acrilica (Figura 7), è un materiale igroscopico e termoplastico, tale caratteristica unita alla sua solubilità in diversi solventi organici testimoniano la natura lineare di questo polimero.⁶⁰

La reazione di polimerizzazione decorre seguendo l'alternanza di due meccanismi: la ciclizzazione intramolecolare e la propagazione radicalica con conseguente formazione di un polimero lineare la cui unità ripetitiva è data da un anello a sei atomi adiacente ad un gruppo etilenico lungo la catena principale. (Figura 8)

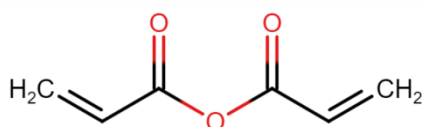


Figura 7

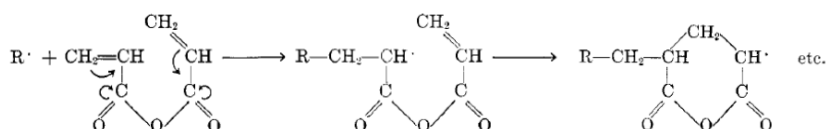


Figura 8

È però necessario distinguere il caso in cui la reazione avvenga esclusivamente tra monomeri identici quindi in presenza di sole molecole di anidride acrilica (omopolimerizzazione) e il caso in cui partecipino altre specie viniliche (copolimerizzazione) come nel nostro caso.

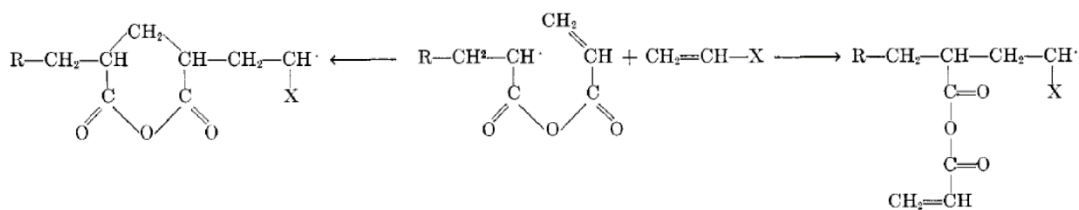


Figura 9

La tendenza a formare un omopolimero e la limitata *driving force* per la chiusura d'anello determinano la formazione predominante di un polimero lineare. Tuttavia, quando all'anidride si aggiunge un monomero vinilico (come è il caso del presente elaborato, discusso in dettaglio in seguito), questo competerà con i gruppi vinilici. Si ha in questo caso la copolimerizzazione dell'anidride acrilica e del monomero vinilico, la propagazione intramolecolare di catena si interrompe in alcuni punti e ivi si forma un sito di *crosslinking*. Quanto detto vale nell'assunzione che permangano le condizioni di stabilità dell'anidride acrilica. In caso contrario, il monomero acido acrilico non è in grado di reticolare, se non per nuova formazione dell'anidride stessa. Durante il lavoro oggetto del presente elaborato è stato sperimentato un approccio alternativo alla polimerizzazione tal quale, ovvero la possibilità di pre-organizzare la tasca di cattura dello ione metallico, già in fase di polimerizzazione, sfruttando l'approccio largamente studiato dei polimeri a impronta molecolare (Molecularly imprinted polymers).

Molecularly Imprinted polymers

I polimeri a impronta molecolare (MIP), sono recettori sintetici per molecole bersaglio specifiche, ottenuti con la tecnica dell'*imprinting* molecolare imitando l'interazione tra recettori e anticorpi in natura.⁵⁵

Tali macromolecole sono descrivibili come analoghi artificiali dei sistemi biologici anticorpo-antigene e, in quanto tali, funzionano con un meccanismo di "serratura e chiave" che permette loro di legare selettivamente la molecola con la quale sono stati plasmati durante la loro produzione: il modello interagisce con i monomeri o il polimero per formare una cavità, successivamente viene rimosso, lasciando la tasca come sito per un nuovo legame con la molecola bersaglio.⁵⁵ (Figura 10)

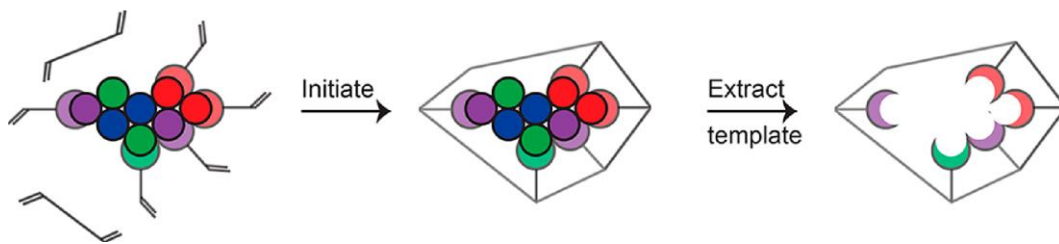


Figura 10⁵⁷

Gli MIP possiedono quindi una caratteristica selettività di cattura, con siti di legame su misura, complementari alla molecola target per forma, dimensione e connettività. Ne deriva un'eccellente capacità di selezione e riconoscimento, simile a quella degli anticorpi tradizionali, ma con una migliore stabilità strutturale.

Inoltre, i MIP sono ottenuti basandosi su legami covalenti, e non, tra i monomeri funzionali comuni e la molecola target, rendendoli materiali generici in grado di complessare un'ampia varietà di specie.⁵⁶

In letteratura si riscontrano molte soluzioni legate a sensori basati su questo approccio.

Tra queste, la review ad opera di Xiaotong Guo⁵⁶ e collaboratori illustra una rassegna di applicazioni che uniscono lo scattering Raman amplificato da superfici ai polimeri ad impronta molecolare per il sequestro dell'analita, sottolineandone le notevoli peculiarità e caratteristiche date dalla commistione delle due applicazioni che portano i sensori SERS basati sugli MIP a suscitare grande interesse nella ricerca per le loro applicazioni versatili, soprattutto nel campo della chemo- e bioanalisi, dimostrando eccellenti prestazioni di identificazione e di rilevamento.⁵⁶

2 MATERIALI E METODI

Strumentazione:

Lo strumento utilizzato per la spettroscopia Raman è un modello *InVia* della *Renishaw*®, dotato di 3 diverse sorgenti laser a diverse lunghezze d'onda e interfacciato direttamente a un microscopio confocale *Leika DM-LM*.

Tra le sorgenti presenti abbiamo un laser ad Argon che emette radiazione centrata a 488 nm e 514 nm, un diodo che emette radiazione a 785 nm ed infine una la sorgente ad He-NE, l'unica utilizzata nel corso di questo progetto, avente un'emissione a 632.8 nm con intensità massima di uscita di 17mW.

Il microscopio ottico è dotato di obbiettivi 5x, 10x, 20x, 50x, e di 2 obbiettivi 100x, della Leica.

Lo spettrofotometro UV-Vis utilizzato è il *Cary5000 National Instrument*, Gli spettri sono stati registrati nell'intervallo compreso tra 200 e 1350 nm in cuvette di quarzo con un cammino ottico di 2 mm. La pulizia della vetreria è stata garantita da lavaggi con acqua regia ($\text{HNO}_3:\text{HCl}$, 1:3).

2.1 Produzione di substrati SERS a partire da oro metallico

Sostanza	numero CAS	MW (g/mol)	densità (g/cm ³)	massa/volume
PVA	9002-89-5	22000	1.2	0.5016 g
NaCl	7647-14-5	58.44	2.16	0.0105
Au elementare	7440-57-5	196.97	19.34	-
Isopropanolo	67-63-0	60.10	0.78	-

Tabella 3

2.1.1 Preparazione inchiostro di nanoparticelle d'oro in soluzione acquosa

Preparazione soluzioni acquose di PVA e NaCl

Viene ottenuta una soluzione di PVA 10 mg/mL in acqua bidistillata pesando 0.5016 g di PVA 22000 Dalton portando a volume in matraccio da 50 mL previo completo discioglimento del solido in una Falcon posta in sonicatore ad ultrasuoni per 60 minuti scaldando fino a 69 °C.

Parallelamente vengono preparati 400 mL di soluzione di NaCl 10 µM in acqua bidistillata tramite diluizione da soluzione madre 3.6 mM, ottenuta sciogliendo 0.0105 g di NaCl in acqua bidistillata portando a volume in matraccio da 50 mL.

Ablazione laser di oro metallico

Il processo di ablazione con laser pulsato condotto in soluzione (Laser Ablation Synthesis in Solution - LASiS) permette di generare soluzioni colloidali di nano particelle (NPs) in assenza sia di reagenti che di stabilizzanti che possono contaminare le particelle generate, ovvero condizionare le loro proprietà superficiali sia fisiche che chimiche. Il grande successo della tecnica risiede nella capacità di ottenere, con relativa semplicità, soluzioni di NPs di molti materiali diversi come metalli, leghe e ossidi.

Il termine "ablazione" si riferisce alla vaporizzazione indotta, sotto forma di plasma, di un materiale solido, nel nostro caso oro, che si genera per effetto della focalizzazione di un fascio laser ad alta potenza sulla superficie del materiale stesso. Il target di oro metallico e un cristallizzatore appositamente modificato per contenerlo vengono prima puliti con acqua regia e poi abbondantemente risciacquati con acqua bidistillata. L'ancoretta magnetica viene solo sciacquata con quest'ultima. Il target è posto nel pozzetto di vetro all'interno del cristallizzatore, in modo che non possa spostarsi durante la procedura. Si versano circa 20 mL di soluzione di NaCl 10 μ M, sufficienti a superare il livello del target d'oro di almeno 2 cm.

Sono stati svolti 5 cicli di ablazione con linea laser a 1064 nm (Laser QSmart Quantel Nd:YAG, impulsi 9ns, 10Hz repetition rate, 1J/cm²), assicurando la perfetta messa a fuoco del raggio incidente sul metallo e monitorando a 30 e 40 minuti dall'inizio di ciascuna ciclo con spettro UV-Vis della soluzione.

Ottenuti in questo modo circa 100 mL di soluzione, riposta in frigorifero a 4 °C.

Formulazione e concentrazione dell'inchiostro di AuNP

In ciascuna di 48 Eppendorf da 1.5 mL vengono introdotti con micropipetta 900 μ L di soluzione di AuNP e 100 μ L di soluzione di PVA 10 mg/mL. Le prime 24 Eppendorf vengono poi poste in centrifuga a 3000 RCF per 30 minuti. Una volta estratte, appare evidente la stratificazione della soluzione, con la porzione sul fondo di ogni provetta di color rosso scuro evidentemente ricca in AuNP.

Viene dunque prelevato manualmente il liquido surnatante trasparente da ciascuna e smaltito.

Il contenuto rimanente viene raccolto tutto in una provetta eppendorf, che subisce un altro ciclo di centrifugazione.

Nel frattempo, si ripete il procedimento con altre 24 eppendorf.

Si ripete la concentrazione con centrifuga e successiva separazione fino al completo esaurimento della soluzione iniziale di AuNP (circa 100 mL).

Al termine si ottengono 4 eppendorf contenenti ciò che rimane dopo la separazione dal surnatante, una per ogni lotto da 24 eppendorf. Le 4 eppendorf ottenute vengono

centrifugate come sopra e a loro volta separate, si ottiene un volume di circa 2 mL di soluzione colloidale, alla concentrazione considerata definitiva.

Per la misura UV-Vis, tale soluzione viene diluita 1 a 50, lo spettro è riportato nella sezione “Risultati e Discussione”.

2.1.2 Stampa a getto d’inchiostro su vetrino con inchiostro a base di AuNP

La stampante inkjet è una Dimatix Fujifilm. I vetrini di spessore 1 mm (utilizzati come substrati per la stampa) sono posti a sonicare in acetone per 15 minuti, successivamente lo stesso lavaggio è ripetuto in IPA.

La cartuccia si compone di due elementi, un serbatoio per l’inchiostro ed un modulo con ugelli piezoelettrici. Quest’ultimo è il più delicato e necessita di cure dedicate. Dapprima si utilizza un serbatoio riempito di solo IPA e si effettuano ripetuti cicli di stampa a perdere. Quindi viene sostituito con il serbatoio per l’inchiostro, riempito con circa 210 μ L di inchiostro preparato il giorno precedente.

Specificato il disegno della stampa (cerchio con 1.5 mm di diametro) e l’ugello da utilizzare, si avvia la stampa con 3 layer di inchiostro.

Si ottengono 4 vetrini, ciascuno con 2 spot circolari stampati, per un totale di 8 substrati. (denominati in seguito spot 1.1, 2.1, 1.2, 2.2, 1.3, 2.3, 4, 5)

La mattina seguente i vetrini sono stati inseriti nel forno tubolare, la fase di cottura termina dopo tre ore dal raggiungimento dei 500°C. Da letteratura, questo trattamento consente di eliminare tutto il PVA, lasciando la superficie d’oro pulita.⁶⁸

2.1.3 *Dropcasting* di AuNP e preparazione per le misure di riferimento

Per la raccolta di spettri SERS di riferimento vengono depositate tramite *dropcasting* 3 gocce da 12 μ L di soluzione di AuNP ottenuta come da paragrafo 2.1.1, sopra un sottile foglio di alluminio incollato ad un vetrino.

Dopo la posa di ogni goccia si asciuga attentamente con pistola termica cercando di convogliare la soluzione in un unico punto.

L'operazione è ripetuta fino alla formazione di quattro spot distinti: 1D, 2D, 3D e 4D (figura 11) sui quali sono state poi svolte le misure SERS che verranno illustrate nel paragrafo 3.3.

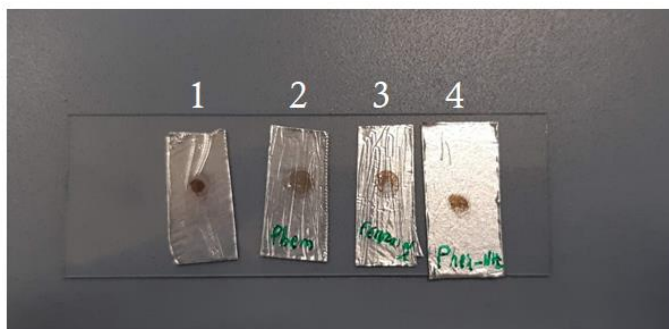


Figura 11- substrati 1D ,2D ,3D e 4D da dropcasting su foglio di alluminio e supporto in vetro.

Soluzione 7.4 mM di 1,10-fenantrolina

Massa di 1,10-fenantrolina monoidrato pesata= 0.0147 g, disciolta in acqua bidistillata prima in un becher tramite viva agitazione e riscaldamento, viene poi portata a volume la soluzione in matraccio da 10 ml.

Soluzione 2.4 mM di 5-ammino-1,10-fenantrolina

Pesati 0.0146g di composto, la bassa idrosolubilità della Phen-NH₂ non permette una concentrazione di 7.4 mM in acqua; perciò, si ottiene una soluzione più diluita (2.4 mM) tramite agitazione, riscaldamento e cauta acidificazione con HCl 0.1 M. Durante la dissoluzione la temperatura è stata aumentata gradualmente fino a 65°C ed è stata necessaria l'aggiunta di HCl 0.1 M, effettuata con 4 aliquote di 30 µL alla soluzione di 6 mL in agitazione (pH finale= ca. 2.7).

Soluzione di ferroina 1 mM

Preparazione soluzione di Fe²⁺ 10.6 mM: pesati 0.0417 g di sale di Mohr e portato a volume con H₂O bidistillata in matraccio da 10 mL.

Preparazione soluzione di ferroina 1 mM: in una eppendorf vengono aggiunti 210 μL di Fe^{2+} 10.6 mM, 810 μL di soluzione di 1,10-fenantrolina 7.4 mM e 980 μL di H_2O bidistillata, arrivando così a 2 mL di soluzione.

In ognuno degli spot ottenuti (1D, 2D, 3D, 4D) sono depositati 20 μL delle varie soluzioni di reagenti sopra descritti. Dopo un breve tempo di incubazione vengono infine stati registrati 3 spettri SERS in altrettanti punti della superficie con obiettivo a ingrandimento 10X, potenza laser al 5%, 2 accumuli di 10 secondi.

2.2 Indagine per la dissociazione quantitativa del complesso $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}$ in soluzione acquosa

Sostanza	numero CAS	MW (g/mol)	Densità (g/cm ³)	Massa/volume
EDTA disodico	6381-92-6	372.24	-	1.8634 g
Fenantrolina monoidrato	5144-89-8	198.22	-	0.0168 g
Sale di Mohr	7783-85-9	392.14	-	0.0097 g
NH ₄ Cl	12125-02-9	53.49	-	3.3870 g
NH ₄ OH 30-33% in acqua	1336-21-6	35.05	0.9	28.6 mL

Tabella 4

Sono state vagliate diverse condizioni per dissociare quantitativamente il complesso $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}$ grazie alla presenza di EDTA. Come sistema di monitoraggio nel tempo si è scelta la spettroscopia Uv-vis, per via della caratteristica colorazione rossa che assume il complesso $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}$.

La banda di assorbimento scelta come riferimento presenta un massimo a $\lambda = 511 \text{ nm}$ e si presenta isolata e ben distinguibile.⁶⁵

In esperimenti precedenti erano già stati fatti dei tentativi con EDTA sia per $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}$, che con il $[\text{Cu}^{2+}(\text{Phen})_3]^{2+}$ con un unico valore di concentrazione (rapporto EDTA/ complesso 10:1). I risultati incoraggianti hanno spinto ad approfondire la reazione misurandone la cinetica e variandone i rapporti stechiometrici.

Gli spettri sono acquisiti con cuvetta di quarzo da 0.2 cm, dagli spettri eseguiti in precedenza con lo stesso cammino ottico viene calcolata la concentrazione minima di complesso per avere un'assorbanza sufficiente (almeno 0.1 unità) per una banda distintiva e isolata con massimo a 511 nm, la stessa monitorata in letteratura⁶⁵. A tale scopo le prove vengono eseguite con concentrazione iniziale di complesso pari 124 μM

Preparazione soluzione madre di EDTA 0.1 M in tampone ammoniacale in matraccio da 50 mL in acqua:

tabella 5

Composto	Massa o volume	Concentrazione finale (M)
NH ₄ OH 30-33% in acqua	28.6 mL	4.63
NH ₄ Cl	3.3870 g	1.26
EDTA disodico	1.8634 g	0.10

Il pH finale è pari a 10.63, misurato con piaccmetro previa calibrazione.

Preparazione soluzione madre di [Fe(Phen)₃]²⁺ 4.96 mM

Vengono pesati 0.0168 g di fenanantrolina monoidrata (da qui Phen) e 0.0097 g di sale di Mohr, scegliendo di lavorare in eccesso di Phen in modo da formare quantitativamente il complesso, rapporto stechiometrico Phen/Fe= 3:1. Il tutto è trasferito in matraccio da 5 mL portato a volume con acqua bidistillata a pH 4.5.

Preparazione soluzione di EDTA 1.240 mM

Da una soluzione EDTA 0.1 M tamponata con tampone ammoniacale vengono prelevati 62 µL e portati a volume con acqua bidistillata neutra, è scelta questa concentrazione perché in rapporto stechiometrico 10 a 1 con il complesso.

Diluizione e reazione in eppendorf da 2 mL con 50 µL di soluzione madre.

Successivamente è stata svolta la misura in modalità cinetica *overnight*: 1 misura ogni 30 minuti, 30 spettri.

Con le stesse modalità di misura, vengono registrate le cinetiche con concentrazioni di EDTA crescenti, in modo da ottenere i seguenti rapporti stechiometrici EDTA/complesso:

20:1 (EDTA 2.48 mM)

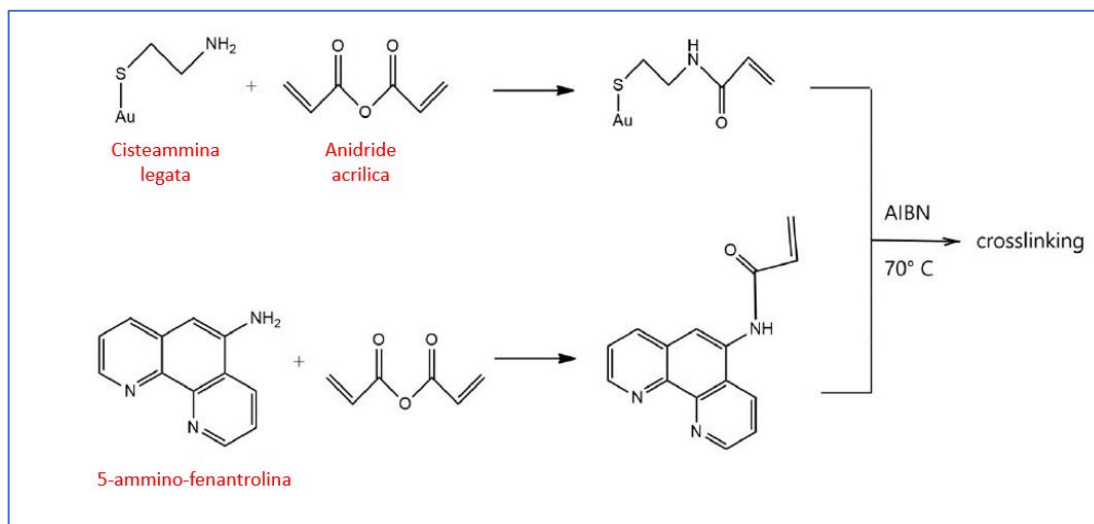
50:1 (EDTA 6.20 mM)

100:1 (EDTA 12.40 mM)

variando la diluizione della soluzione madre di EDTA 0.1 M di cui sopra.

I risultati sono riportati al paragrafo 3.4.

2.3 Funzionalizzazione dei substrati stampati con sintesi convergente



Schema di reazione 1: sintesi convergente che caratterizza il primo approccio attuato. Nello schema la cisteamina ha già reagito con la superficie d'oro.

Tabella 6

Sostanza	numero CAS	MW, (g/mol)	Densità (g/ml)	massa/volume
DMF	68-12-2		0.94	-
DMF anidro	68-12-2		0.94	-
Anidride acrilica	2051-76-5	126.11		
PhenNH ₂	54258-41-2	195.22		0.0293g
Cisteamina	60-23-1	77.15	-	0.0426 g
Sale di Mohr	7783-85-9	392.14	-	0.0332 g
AIBN	78-67-1	164.21		0.0012 g

2.3.1 Funzionalizzazione delle superfici SERS con PhenNH₂ libera (approccio 1)

Preparazione soluzione di cisteamina 0.11 M:

Pesati 0.0426 g di cisteamina e portati a volume in matraccio da 5 mL in DMF, dopo aver fatto sciogliere tutto il composto tramite sonicazione.

Coupling tra cisteammina e nanoparticelle:

Dopo aver posto i vetrini 1 e 2 in una piastra di Petri, vengono introdotti esattamente 7 mL di DMF con pipetta tarata e poi 64 μ L di soluzione di cisteammina 0.11 M sotto agitazione.

La reazione procede per 4 ore a temperatura ambiente.

Al termine, i vetrini vengono estratti e la miscela di reazione versata in una vial. I vetrini e la piastra di Petri sciacquati accuratamente con DMF, infine i vetrini vengono nuovamente ricoperti da DMF e chiusi nella stessa piastra.

Vengono lavate accuratamente 3 vial in vetro e poste in stufa a 120°C per 120 minuti per far desorbire l'acqua dalle pareti e dai tappi in gomma, la stessa procedura è prevista per le ancorette magnetiche.

Vial 1: Reazione di ammidazione PhenNH₂/anidride acrilica

Nella vial 1 vengono fatti reagire 0.0293 g di Phen sciolti in 2 mL di DMF anidro (da qui DMFa) con 6.2 μ L di anidride acrilica (AA) pura sciolti in 0.5 mL di DMFa, aggiungendo altri 2.5 mL di solvente si ottiene una soluzione di 5 mL con concentrazioni indicative: PhenNH₂= 30 mM; AA= 10 mM.

Vial 2: reazione di ammidazione cisteammina/anidride acrilica

Nella vial 2 vengono immersi i substrati precedentemente funzionalizzati con cisteammina in una soluzione contenente AA (10 mM) e trietilammina (20 mM) in DMFa.

Entrambe le vial sono poste in agitazione, coperte da foglio di alluminio, in un bagno di acqua e ghiaccio.

Tutte le aggiunte di reagenti e solvente alle vial 1 e 2 sono state effettuate con l'uso di siringhe pulite attraverso il setto in gomma delle vial.

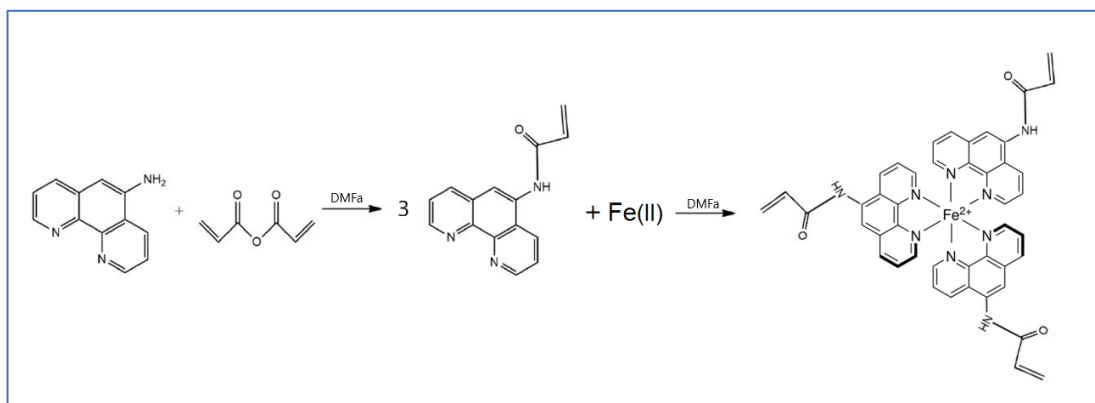
Le reazioni sono state lasciate decorrere overnight, in agitazione.

Polimerizzazione dell'anidride acrilica

I substrati vengono estratti e sciacquati con DMFa. La vial 1 viene tolta dall'involucro di alluminio e al suo interno sono introdotti con cautela i substrati. Inizia la reazione con l'introduzione, durante agitazione, di 0.6 mg di AIBN (2-2'-azobisisobutirronitrile) precedentemente pesati. Successivamente la vial 1 viene chiusa e posta in un bagno di acqua a 70°C, sotto agitazione. La reazione decorre overnight.

Al termine, il vetrino contenente i substrati viene estratto e lavato con DMF.

2.3.2 Funzionalizzazione delle superfici SERS con PhenNH₂ pre-complettata (approccio 2)



Schema di reazione 2-Variante della sintesi di cui al paragrafo 2.3 che caratterizza il secondo approccio attuato

A partire da spot stampati privi di funzionalizzazione, sono state svolte le reazioni di coupling e di ammidazione della 5-amminofenantrolina con la stessa procedura adottata al paragrafo 2.3.1, successivamente, a differenza della procedura ivi descritta, viene fatto reagire il prodotto dell'ammidazione della PhenNH₂ con AA nella vial 1 con gli ioni Fe (II) derivanti dalla dissoluzione di sale di Mohr direttamente nella miscela di reazione, in modo da formare il complesso prima della polimerizzazione radicalica sui substrati.

Formazione del complesso tra ioni ferro(II) e 5-acrillammido-1,10-fenantrolina.

Nella vial 1 sono stati introdotti 0.0332 g di sale di Mohr a poco a poco durante agitazione.

La miscela di reazione è stata sottoposta diverse volte al sonicatore, a mano a mano che il sale si scioglie, la soluzione dapprima color giallo paglierino si tinge di rosso vivo, ciò suggerisce la formazione del complesso derivato della ferriina, le cui soluzioni in acqua e in DMF sono caratterizzate dallo stesso colore. Le moli di ferro sono in eccesso, in modo da sopperire al discioglimento non completo del sale di Mohr in DMFa.

Al termine, è stata svolta la polimerizzazione come da procedura al paragrafo 2.3.1

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati in seguito presentati e discussi verranno divisi in capitoli per agevolare la lettura. Nondimeno questi si inquadrano in uno sviluppo progettuale che prevede la funzionalizzazione di substrati SERS stampati inkjet con un chelante Fenantrolina per la cattura e caratterizzazione mediante spettro SERS di specie cationiche. Nell'ottica di rendere riutilizzabile il substrato funzionalizzato, viene studiata la reversibilità della complessazione grazie ad un eccesso di EDTA. Spettri SERS di riferimento delle varie specie verranno altresì acquisiti su substrati ottenuti per drop-casting al fine di migliorare le attribuzioni spettrali.

3.1 Caratterizzazione dell'inchiostro di AuNP

Di seguito viene riportato lo spettro di assorbimento UV-Vis dell'inchiostro di AuNP in soluzione acquosa di NaCl 10 μ M registrato con spettrofotometro Cary 5000 nell'intervallo 300-800 nm, in cuvetta di quarzo con cammino ottico 2 mm.

Lo spettro è stato registrato previa diluizione della soluzione concentrata ottenuta con la stessa soluzione salina di cui sopra, come riportato nel paragrafo 2.1.1.

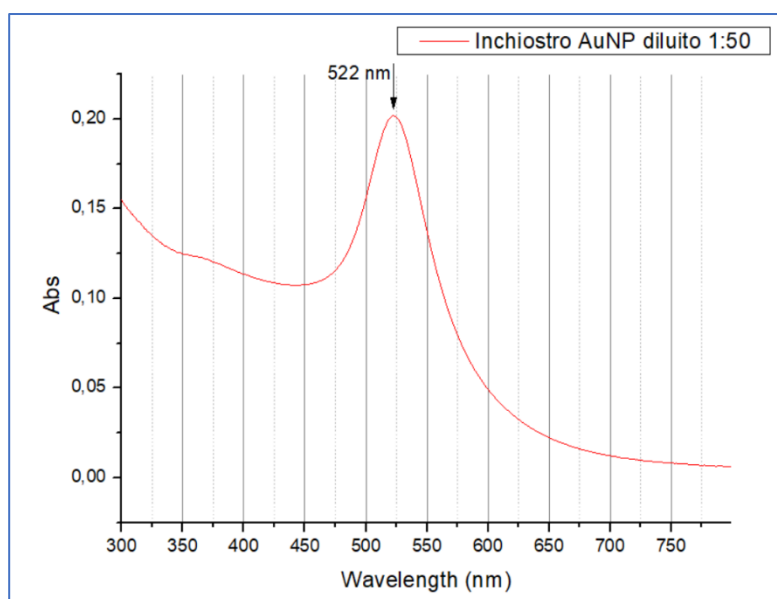


Figura 12-spettro UV-Vis della soluzione diluita di inchiostro di AuNP

Il profilo spettrale risulta chiaro, con il massimo della banda di assorbimento centrata a 522 nm, tipica delle nanoparticelle d'oro di dimensioni comprese tra 10 e 20 nm, che si attesta ad un valore di assorbanza pari a 0.202 unità.

Tale banda appare ben risolta, ciò indica l'assenza di agglomerati in concentrazione problematica e dunque la buona qualità dell'inchiostro ottenuto, dato dalla stabilità delle particelle in soluzione colloidale. In particolare, l'indice a cui fare riferimento è l'assorbanza a 400 nm, in questo caso 0.114 unità.

La concentrazione dell'inchiostro non diluito è stimata dallo spettro di assorbimento a circa $8 \cdot 10^{-9}$ M, grazie ad una procedura basata su simulazioni agli elementi finiti precedentemente pubblicata.⁶⁶

3.2 Dropcasting e stampa inkjet printing su vetro

Vengono riportate alcune fotografie dei substrati 1, 2, 3 e 4 ottenuti per *dropcasting* dell'inchiostro di AuNP su foglio di alluminio per l'acquisizione degli spettri SERS di riferimento della superficie tal quale (1) di Phen (2), di $[\text{Fe}(\text{PhenNH}_2)]^{2+}$ (3) e di PhenNH₂ (4). Per distinguere questi spot da quelli stampati, a ciascun numero è aggiunta la lettera D.

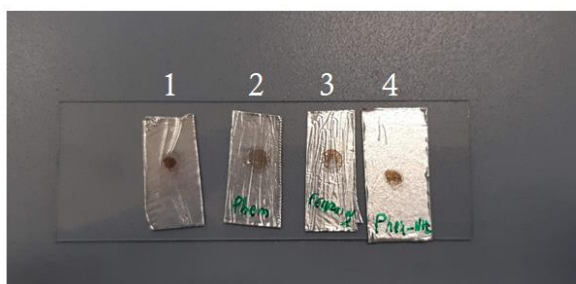


Figura 13- substrati 1,2,3 e 4 da *dropcasting* su foglio di alluminio e supporto in vetro.

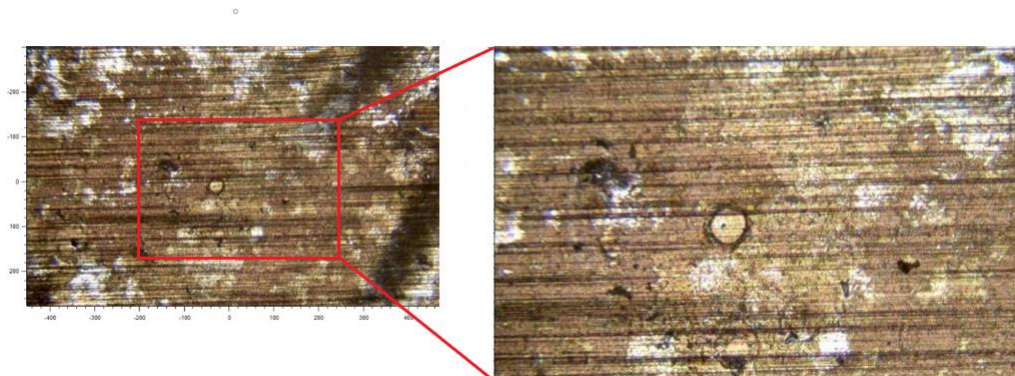
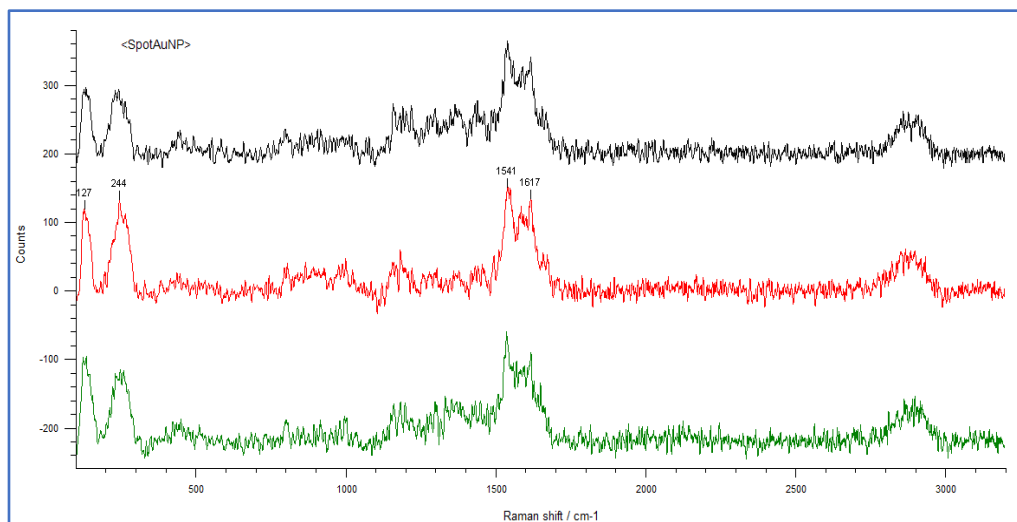


Figura 14-Sopra, fotografie ad ingrandimento 5X (sx) e 10X (dx) della medesima zona dello spot numero 4 ottenuto per dropcasting

Figura 15-(Sotto) spot 1D, tre spettri Raman SERS di tre punti diversi della superficie dopo dropcasting di AuNP, ottenuta tramite drop casting su foglio di alluminio.



In figura 15 si riportano i tre spettri registrati in altrettanti punti dello spot 1D prima dell'aggiunta delle soluzioni di reagenti, al fine di acquisire il contributo del background. Gli spettri sono stati sfasati in verticale per poter meglio visualizzare il confronto.

Si può notare come i segnali presenti in ciascuno spettro si ripetano quasi perfettamente nei tre punti campionati, sia per quanto concerne i valori di Raman

shift dei principali picchi, sia per le intensità assolute e relative, inquanto gli spettri non sono normalizzati. Se ne deduce quindi una buona omogeneità superficiale.

A titolo dimostrativo dei risultati finali della stampa, sono riportate alcune fotografie dei substrati stampati in 2D mediante inkjet printing su vetro, eseguite con obiettivo 5X (Figura 16 e 17) e 10X (figura 18) del microscopio accoppiato allo spettrofotometro Raman Renishaw, che sono stati utilizzati nelle successive funzionalizzazioni e misure SERS. Come si evince dalla scala graduata, il diametro di ogni substrato è 1.5 mm. Tali superfici, costituite da strati, si sono dimostrate notevolmente resistenti e stabili per diversi mesi, conservate sia a contatto con aria sia immerse in acqua deionizzata.

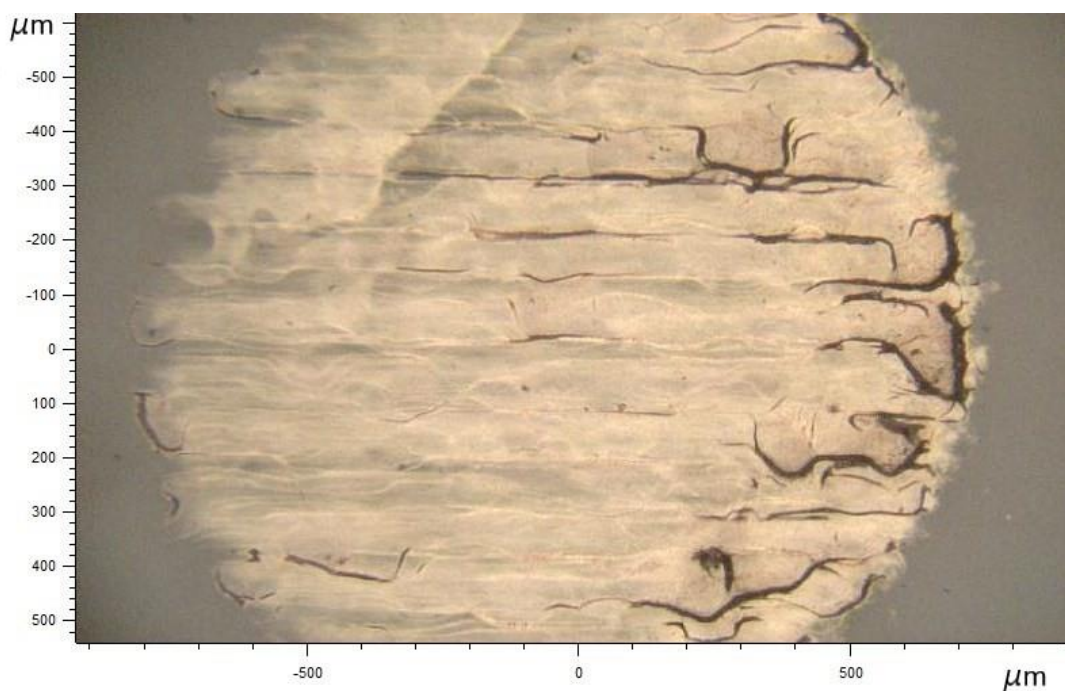


Figura 16-Fotografia di uno dei substrati (spot) stampati a getto d'inchiostro di AuNP, ingrandimento 5X.



Figura 17-due spot stampati a getto d'inchiostro di AuNP su vetrino, ingrandimento 5X

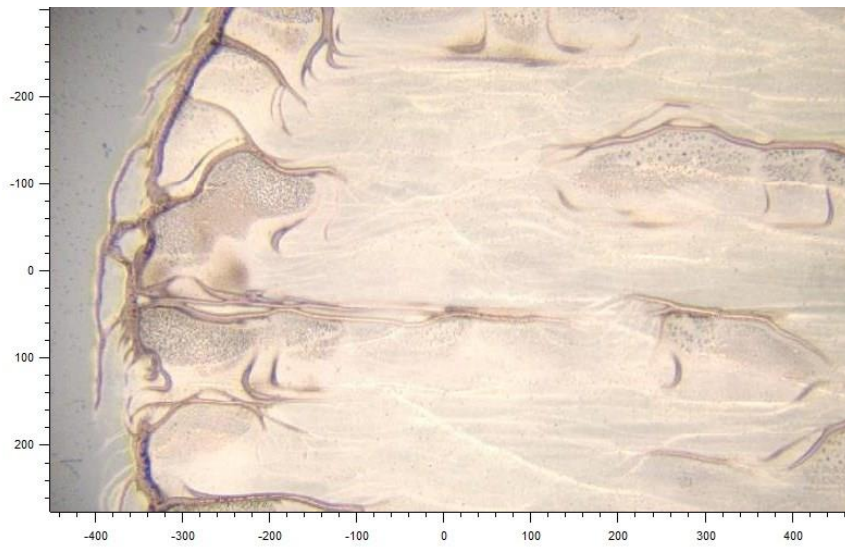
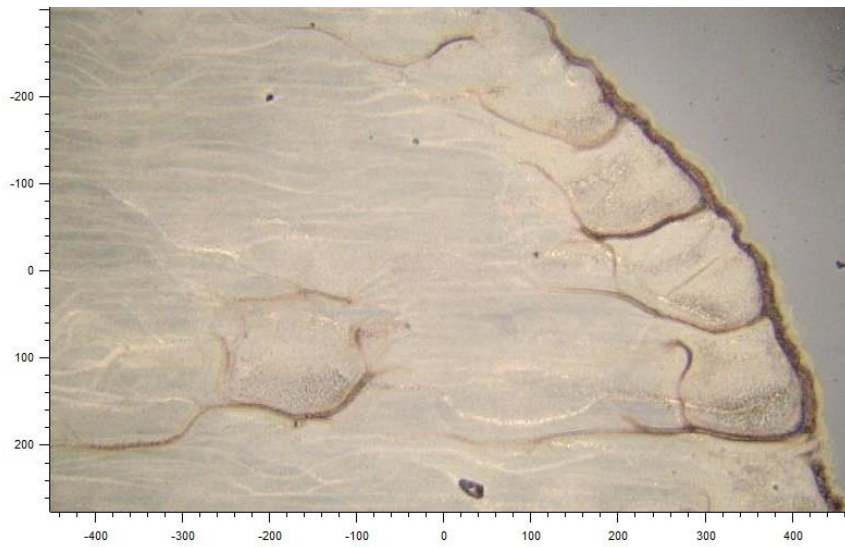


Figura 18-Dettaglio di due differenti spot stampati, ingrandimento 10X, scala in micrometri



In figura 19 è riportato lo spettro ottenuto dalla media di 20 misure su altrettanti punti campionati sullo spot 4, prima di qualsiasi funzionalizzazione e dunque rappresentativo del profilo spettrale di base, utile per il confronto delle misure successivamente. Lo spettro è privo di picchi significativamente intensi, i segnali principali hanno intensità di 60 e 69 conte, e si riscontrano rispettivamente a 1498 e 1565 cm^{-1} .

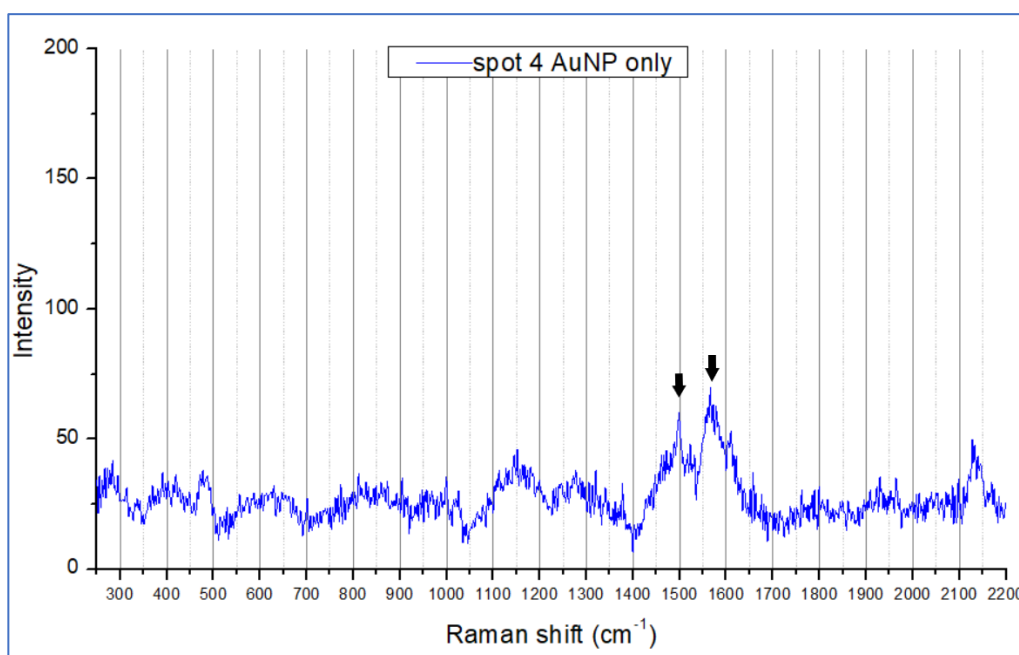


Figura 19-Spettro SERS medio di 20 punti campionati sullo spot 4 privo di analita.

L'assenza di segnali intensi forniti dalla superficie vergine del substrato, che ripeto essere prodotta in modo automatizzato e dunque riproducibile, è un'ottima caratteristica ai fini delle caratterizzazioni successive, poiché il problema di interferenze e rumore ambientale è molto limitato.

3.3 Spettri SERS di riferimento

In seguito vengono riportati gli spettri SERS di riferimento, ottenuti dagli spot 2D, 3D, 4D e 5D, ovvero AuNP depositate per dropcasting su foglio di alluminio. Nello spot 2D viene depositata della 1,10-fenantrolina, in 3D della 5-ammino-1,10-fenantrolina e nello spot 4D viene depositata della Ferroina, ovvero il complesso della 1,10-fenantrolina con il Fe^{2+} . Nello spot 5D si deposita il complesso ferroina, ottenuto questa volta con la 5-ammino-1,10-fenantrolina. Questi spettri hanno lo scopo di rendere possibile, chiara ed immediata l'attribuzione dei contributi spettrali per le misure sui substrati stampati e funzionalizzati, ricchi di molte più specie chimiche che possono dare i loro contributi.

Ciascuna delle immagini contiene tre spettri sovrapposti, acquisiti sul medesimo substrato, registrati in successione ma in punti differenti della superficie.

Spettri SERS di 1,10-fenantrolina

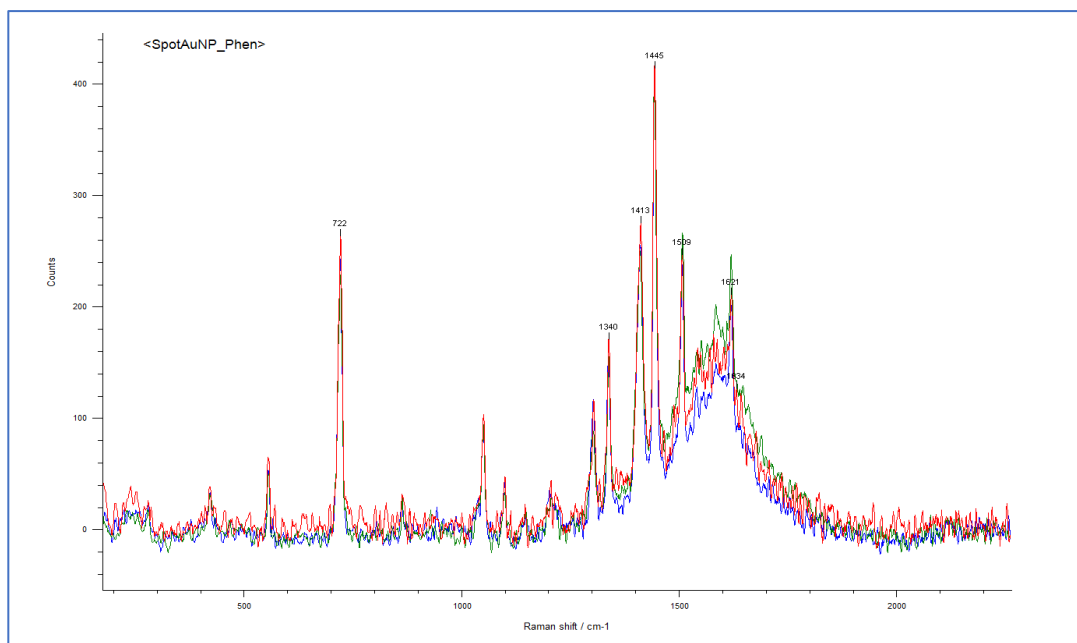


Figura 20-Tre spettri SERS acquisiti in tre punti distinti del substrato di AuNP ottenuto per dropcasting (spot 2D) con soluzione acquosa 7.4 mM di 1,10-fenantrolina depositata.

Spettri SERS di 5-ammino-1,10-fenantrolina (PhenNH₂)

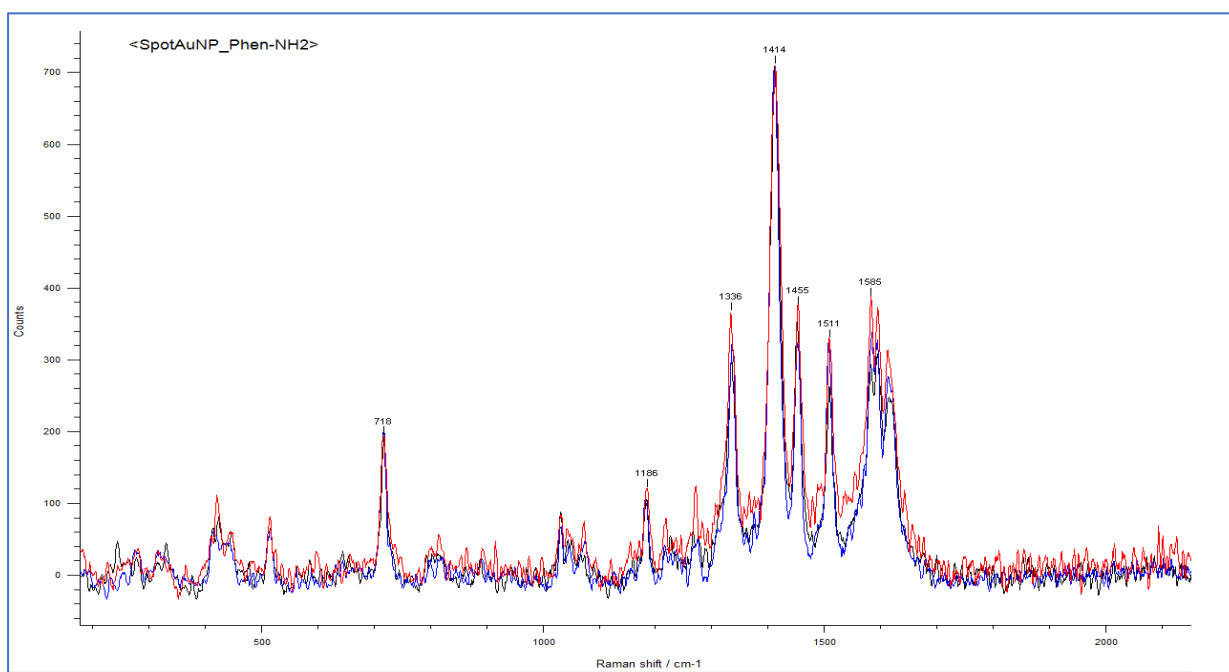


Figura 21- Tre spettri SERS acquisiti in tre punti distinti del substrato di AuNP ottenuto per dropcasting (spot 4D) con soluzione acquosa 2.4 mM di 5-ammino-1,10-fenantrolina depositata.

Spettri SERS di [Fe(Phen)₃]²⁺ (ferroina)

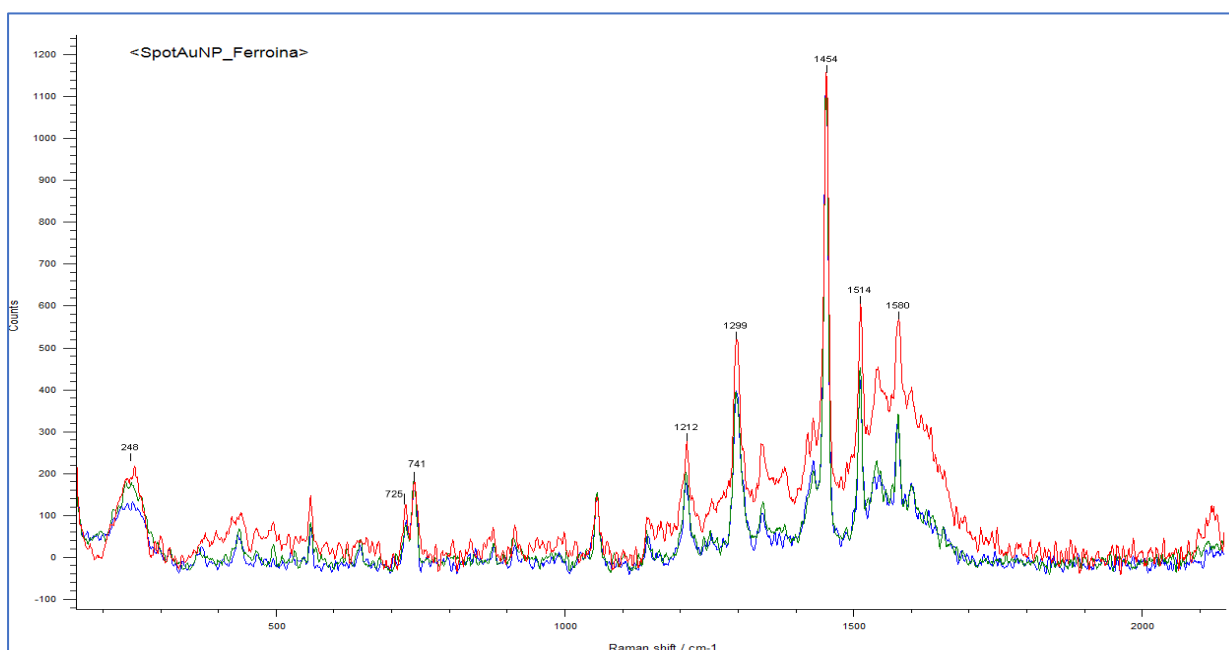


Figura 22- Tre spettri SERS acquisiti in tre punti distinti del substrato di AuNP ottenuto per drop casting (spot 3D) con soluzione 1.0 mM di [Fe(Phen)₃]²⁺ depositata

Spettri SERS di $[\text{Fe}(\text{PhenNH}_2)_3]^{2+}$ (ferroinaNH₂)

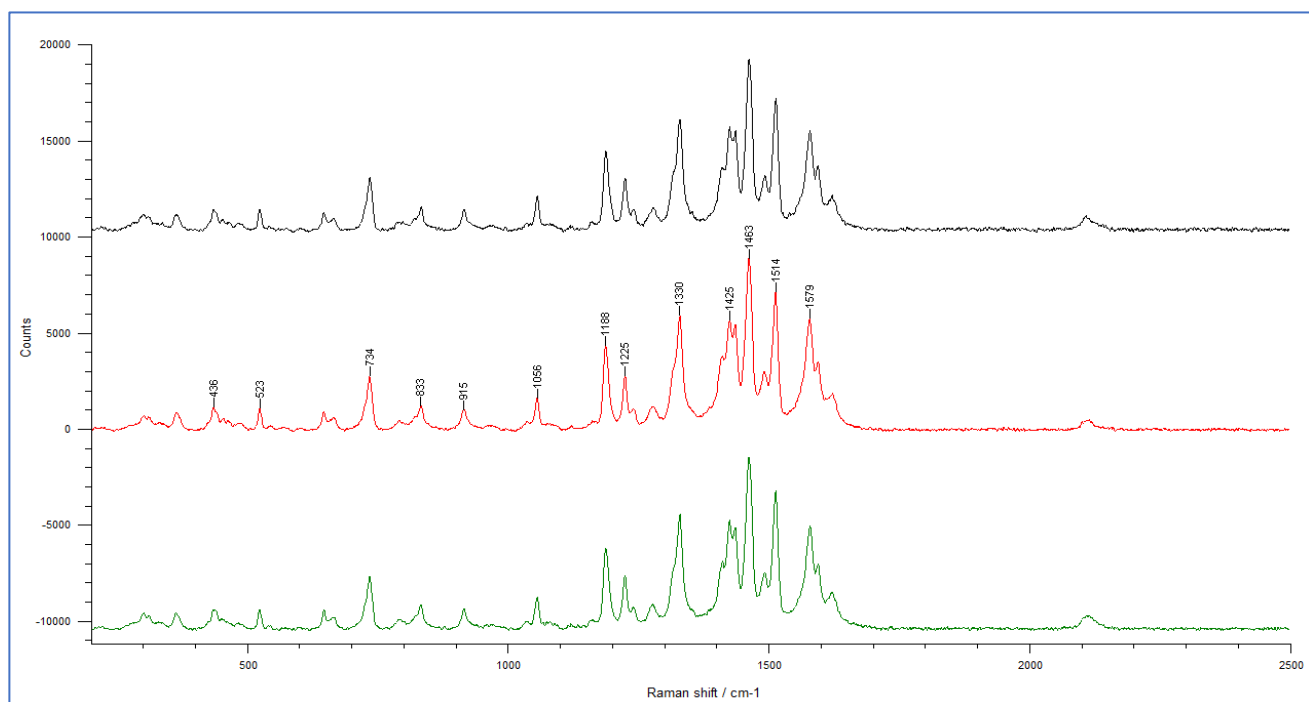


Figura 23-Tre spettri SERS acquisiti in tre punti distinti del substrato di AuNP ottenuto per drop casting (spot 5D) con soluzione 1.0 mM di $[\text{Fe}(\text{PhenNH}_2)_3]^{2+}$ depositata

Come si può notare dagli spettri, i segnali fatti registrare da ciascuno spot si ripetono quasi perfettamente nei tre punti campionati, anche per quanto concerne le intensità relative, aspetto incoraggiante per quanto riguarda la ripetibilità della misura.

I segnali più intensi, che forniscono le principali informazioni utili al confronto, sono di seguito riassunti:

Tabella 7

AuNP + Phen (cm ⁻¹)	AuNP + PhenNH ₂ (cm ⁻¹)	AuNP + Ferroina (cm ⁻¹)	AuNP+ FerroinaNH ₂ (cm ⁻¹)
722	718	741	734
	1186		1188
		1212	1225
1340	1336	1299	1330
1413	1414		1425
1445	1455	1454	1463
1509	1511	1514	1514
	1585	1580	1579
1621			

Tali spettri vanno a costituire un insieme di dati su cui è possibile basare un confronto con le successive analisi svolte su substrati stampati e funzionalizzati, attraverso la misura dell'accordo tra i pattern di picchi spettrali.

Più che un'analisi del singolo segnale, con precisa assegnazione di ogni modo normale infatti, si mira al riconoscimento del *fingerprint* dell'analita, l'impronta digitale molecolare che permetta la sua identificazione in modo univoco.

Ciò che appare in modo chiaro in fig. 22 è la notevole riduzione di intensità del picco a 725 cm^{-1} nello spettro del complesso, quando negli spettri dei singoli leganti si presenta molto intenso a 722 cm^{-1} (fig.20) e 718 cm^{-1} (fig.21). Nel complesso, tale segnale è invece trascurabile e affiancato al segnale a 741 cm^{-1} che, seppur debole, è invece totalmente assente nei precedenti spettri.

Le variazioni spettrali più rilevanti riguardano però l'intervallo da 1330 a 1550 cm^{-1} , in cui la differenza dello spettro della ferrioina è evidente. In primo luogo si ha completa scomparsa del picco a 1414 cm^{-1} , che invece negli spettri dei leganti costituisce il segnale principale (fig.21) od il secondo più intenso (fig.20). Nel caso del complesso, il segnale a 1455 cm^{-1} è nettamente il più intenso, lo stesso è presente molto chiaramente nello spettro della Phen-NH₂.

Il picco presente tra i 1509 e 1514 cm^{-1} caratterizza invece, senza particolari variazioni di intensità relativa, tutti gli spettri di riferimento.

3.4 Indagine per la dissociazione quantitativa del complesso $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}$ in soluzione acquosa.

In questa fase viene approfondita la reversibilità della complessazione dello ione Fe^{2+} da parte della 1-10 fenantrolina, ad opera di un eccesso di EDTA.

Come anticipato nel capitolo 2, a tale scopo è stato utilizzato EDTA disodico in tampone ammoniacale come agente complessante per verificare la possibilità di attuare la reazione di scambio di legante:



Sebbene per il sistema che stiamo sviluppando il legante sia costituito da 5-ammino-1,10-fenentrolina (PhenNH_2), recante dunque un gruppo amminico in posizione 5, per i test svolti qui in seguito, viene utilizzata 1-10 fenantrolina monoidrato, facendo riferimento a questa per tutti i dati e le costanti.

Di seguito vengono riportati i diagrammi ricavati dai dati delle misure di assorbimento UV-Vis volti ad individuare l'ordine cinetico della reazione tra il complesso e l'EDTA.

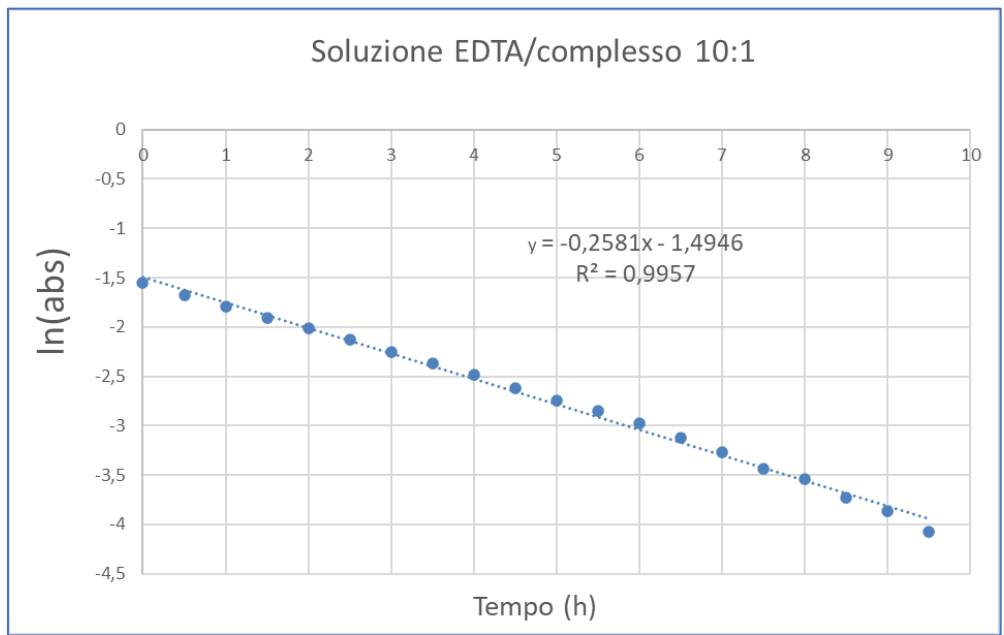
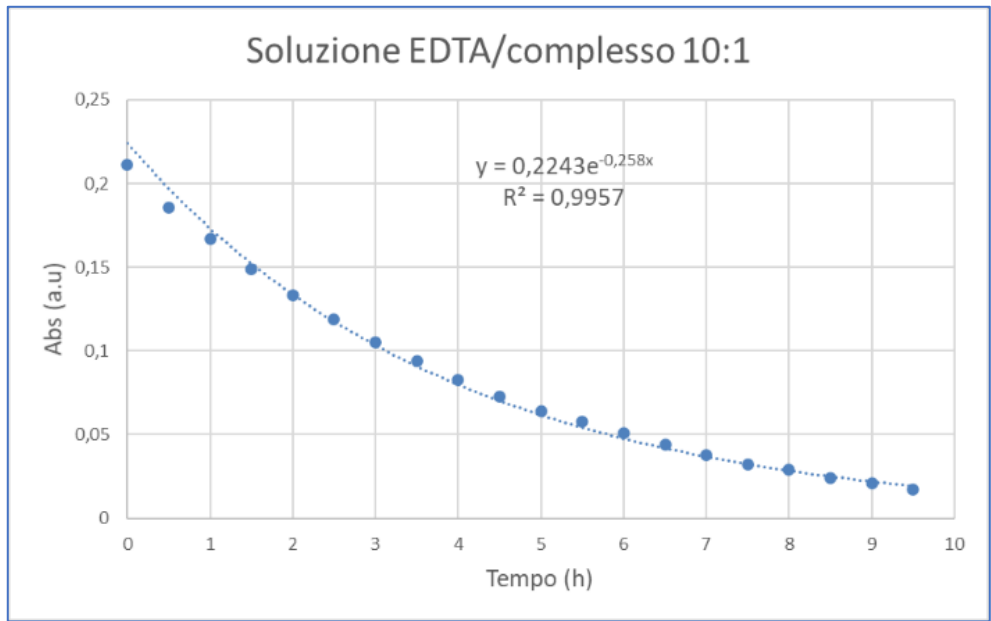


Figura 24 (sopra) e Figura 25 (sotto): Diagramma del fitting ottenuto rispettivamente con funzione esponenziale e lineare dei dati di assorbanza a 511 nm (sopra) e $\ln(\text{abs})$ (sotto) contro il tempo di reazione riferiti alla soluzione di ferroina 124 μM + EDTA 1.24 mM.

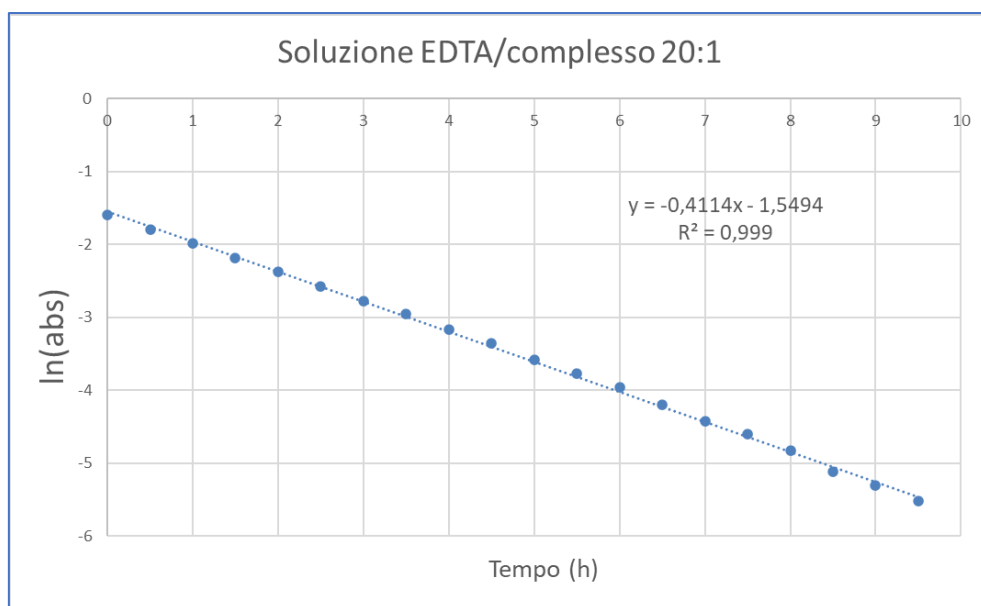
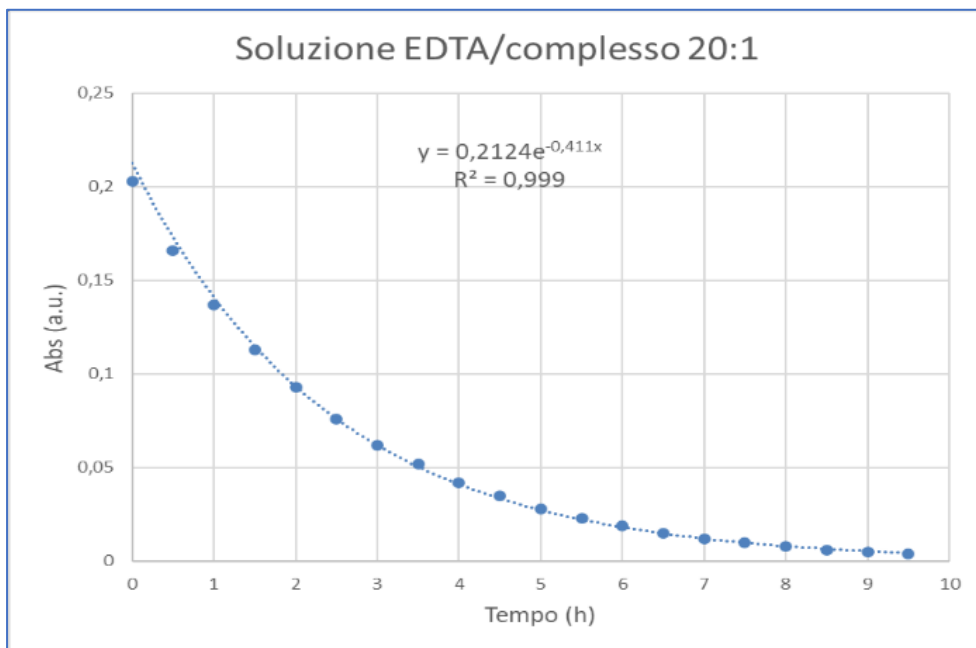


Figure 25 (sopra) e Figura 26 (sotto): Diagramma del fitting ottenuto rispettivamente con funzione esponenziale e lineare dei dati di assorbanza e $\ln(\text{abs})$ contro il tempo di reazione riferiti alla soluzione di ferrioina $124 \mu\text{M}$ + EDTA 2.48 mM .

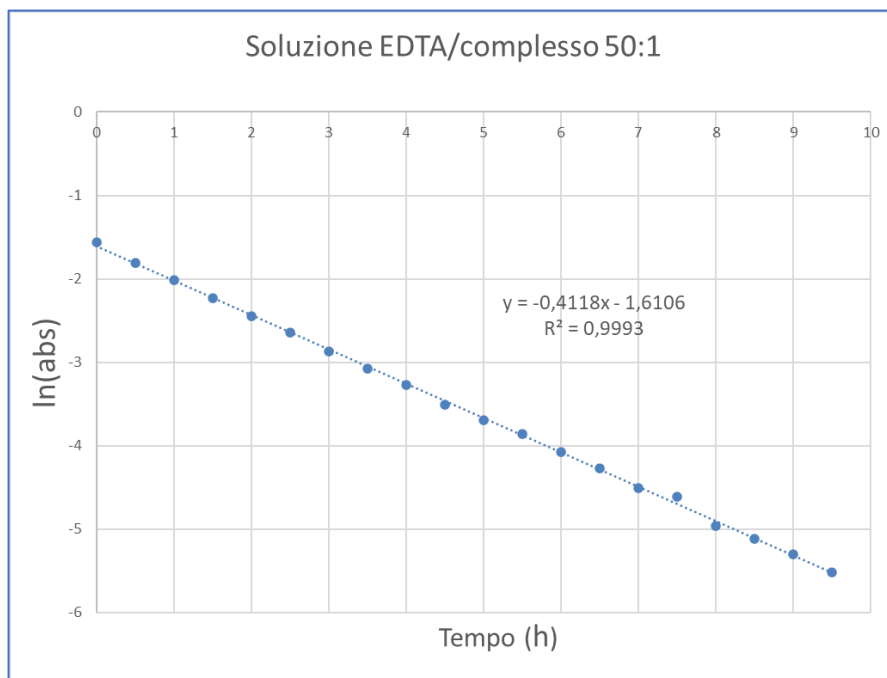
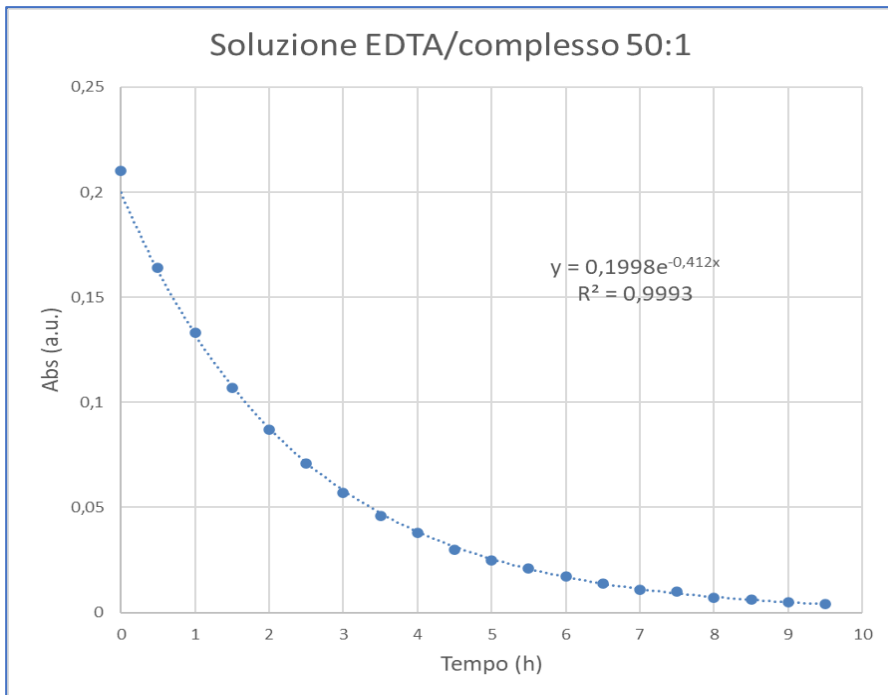


Figure 27 (sopra) e 28 (sotto) : Diagramma del fitting ottenuto rispettivamente con funzione esponenziale e lineare dei dati di assorbanza e $\ln(\text{abs})$ (dx) contro il tempo di reazione riferiti alla soluzione di ferroina $124 \mu\text{M}$ + EDTA 6.20 mM .

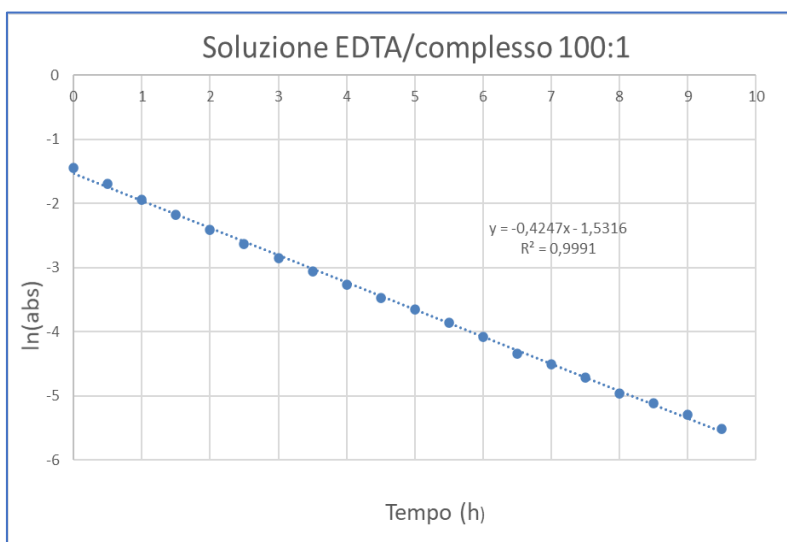
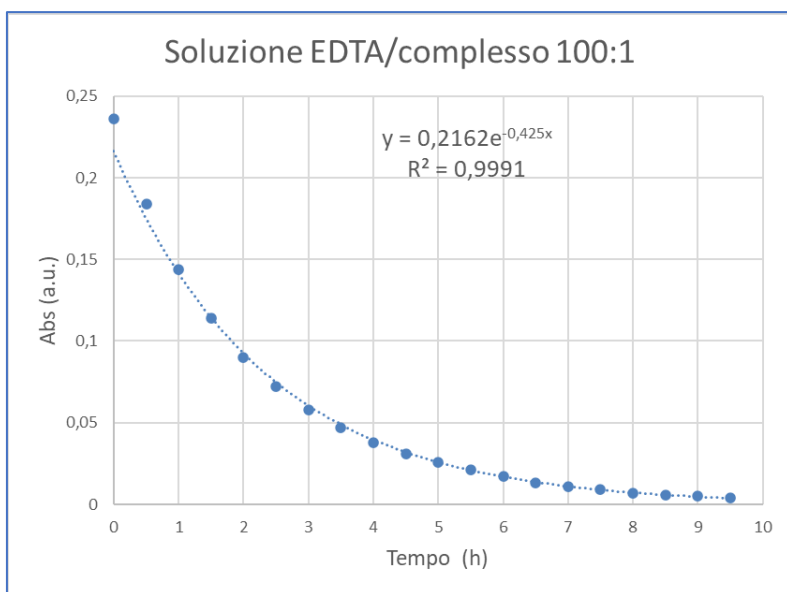


Figure 29 (sopra) e 30 (sotto): Diagrammi del fitting ottenuto rispettivamente con funzione esponenziale e lineare dei dati di assorbanza e $\ln(\text{abs})$ contro il tempo di reazione riferiti alla soluzione di ferroina $124 \mu\text{M}$ + EDTA $12,4 \text{ mM}$.

I dati ottenuti dalle misure di assorbimento UV-Vis ci permettono di trarre alcune importanti conclusioni:

- il complesso $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}$ viene efficacemente scomposto in tutte le condizioni stechiometriche vagliate

- A fine reazione, la concentrazione del complesso raggiunge concentrazioni trascurabili, in relazione alle performance dello strumento, in un tempo utile compatibile con le finalità dello studio.
- Oltre un eccesso stechiometrico EDTA/[Fe(Phen)₃]²⁺ di 20:1, la concentrazione iniziale del primo reagente non influisce significativamente sul raggiungimento di una concentrazione di ferroina ad assorbanza trascurabile, a parità di intervallo di tempo (10 ore).
- La reazione di dissociazione del complesso ferroina segue, con ottimo accordo, una cinetica del primo ordine, evidenziato dall'andamento andamento lineare (con pendenza negativa) tra il logaritmo naturale dell'assorbanza, e il tempo di contatto. L'accordo con il modello lineare è testimoniato dai valori del coefficiente di determinazione R quadro molto vicini ad 1 (nell'ordine dei diagrammi riportati: 0.9957, 0.9990, 0.9993, 0.9991)
- Il rapporto stechiometrico EDTA/[Fe(Phen)₃]²⁺ di 10:1 non garantisce una dissociazione quantitativa e la reazione decorre con una costante cinetica stimata significativamente inferiore rispetto ai tutti i casi successivi, che al contrario hanno costanti molto simili.

In tabella 8 vengono riportate le stime delle costanti cinetiche sperimentali arrotondate alla seconda cifra decimale:

Rapporto stechiometrico EDTA/ferroina	Costante cinetica stimata (s⁻¹)
10:1	0.26
20:1	0.41
50:1	0.41
100:1	0.42

Tabella 8

Malgrado le curve cinetiche suggeriscano una cinetica del primo ordine, si ipotizza che si tratti piuttosto di un cosiddetto pseudo-primo ordine. Infatti, una reazione puramente al primo ordine prevedrebbe un decomplessazione spontanea della ferroina. L'alta costante termodinamica di quest'ultima ($\log\beta=21.5$)^{30,31} suggeriscono che questa eventualità sia molto poco probabile. Inoltre, il ruolo dell'EDTA è evidente. Per questi motivi, e per via che l'EDTA è utilizzato in forte eccesso, si ipotizza una cinetica del pseudo-primo ordine, dove la concentrazione del reagente in eccesso rimane pressoché inalterata e quindi non pare influire sulla costante di velocità apparente.

3.5 Produzione di substrati funzionalizzati ed analisi SERS

Tutte le misure Raman son state eseguite con la linea laser a 633 nm con spettrofotometro μ Raman InVia *Renishaw*, sorgente He-Ne.

3.5.1 Caratterizzazione della sintesi convergente sui substrati stampati

Lo schema di reazione per la produzione dei substrati stampati funzionalizzati segue lo schema e la procedura riportati nel capitolo 2.3. Tra tutte le reazioni descritte, solo quella tra 5-amino-1,10-fenantrolina avviene in fase omogenea in solvente DMF, mentre tutte le altre avvengono in fase eterogenea sulla superficie del substrato stampato. La tecnica scelta per monitorare l'andamento della sintesi è la spettroscopia Raman, nella fattispecie sfrutteremo l'effetto SERS dei substrati stampati.

1. Adesione di cisteamina all'Au del substrato stampato

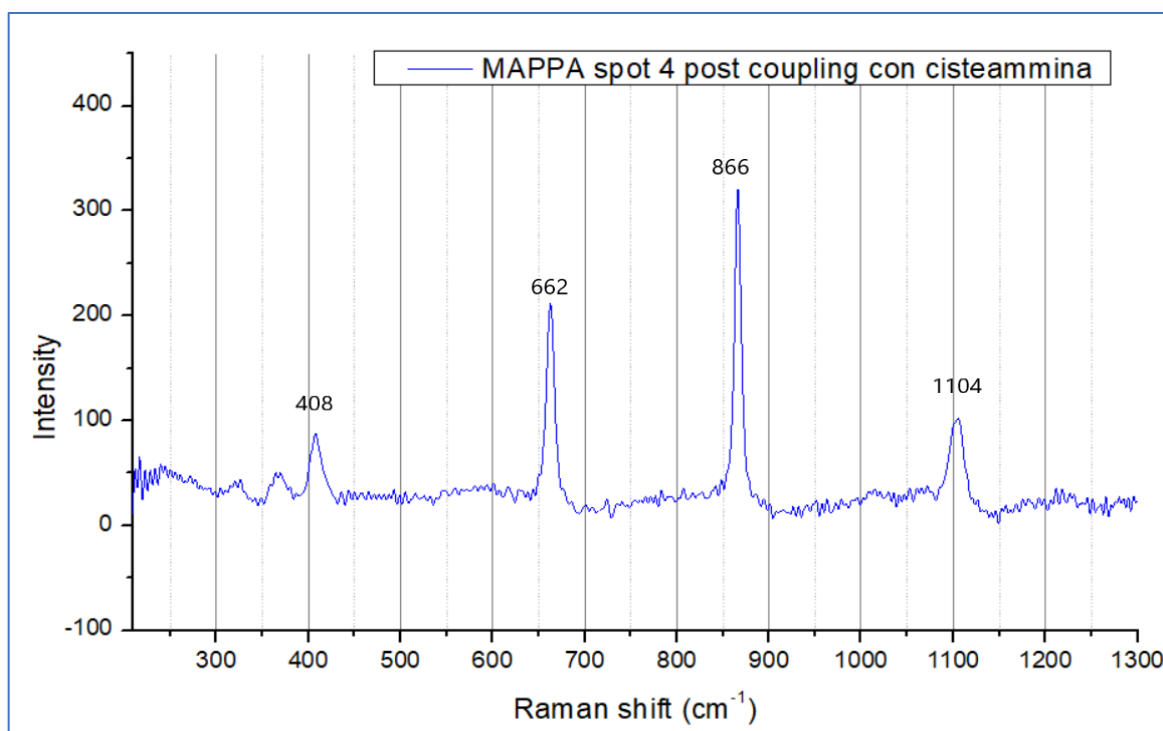


Figura 31-mappa SERS registrata sullo spot 4 dopo la reazione con cisteamina

2. Polimerizzazione radicalica del substrato stampato con acrilammide terminale e complesso già formato (secondo l'approccio numero 2)

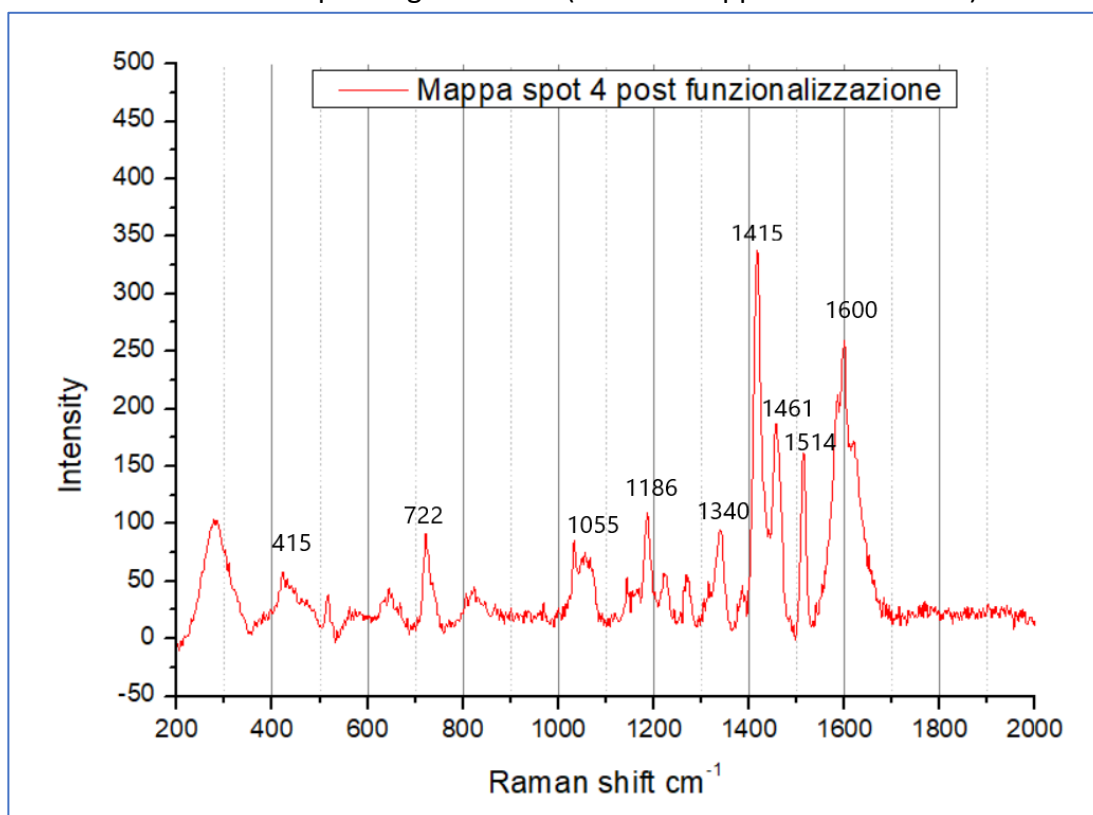


Figura 32-Mappa SERS registrata sullo spot 4 dopo completa funzionalizzazione

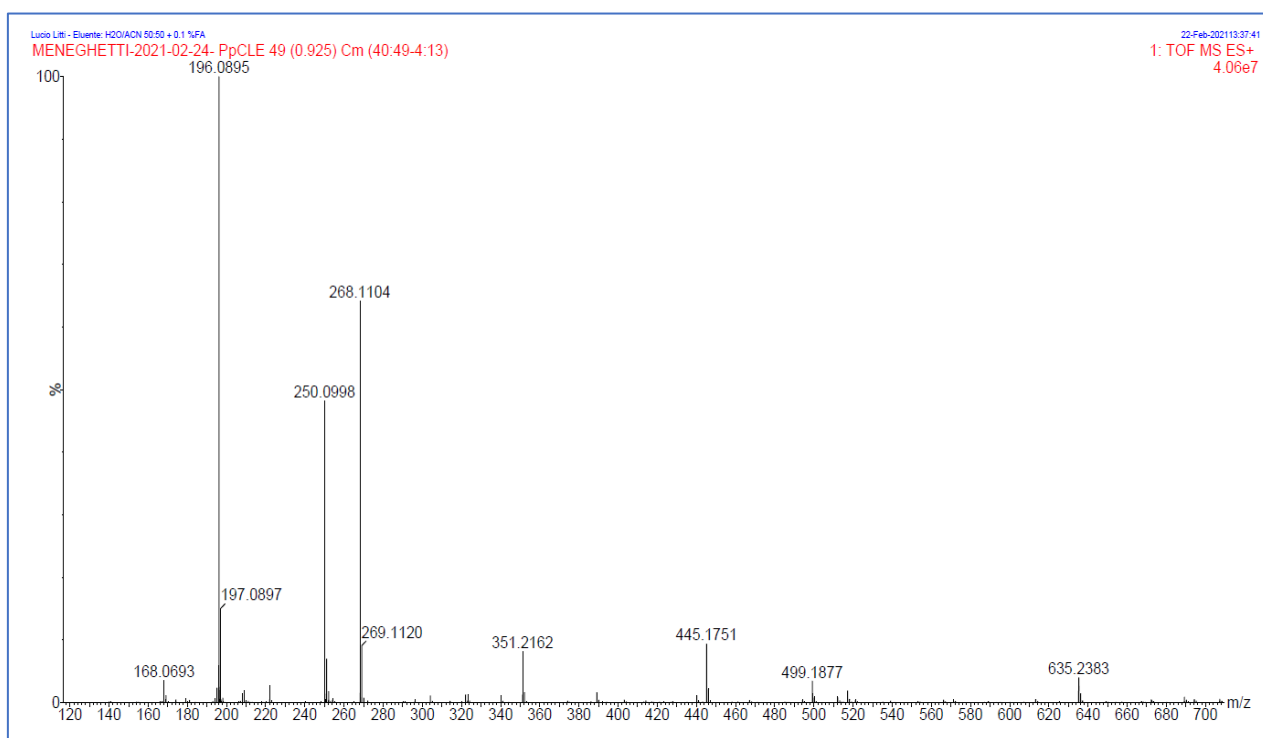
In figura 19 nel paragrafo 3.2 viene altresì presentato lo spettro del substrato prima di qualsiasi funzionalizzazione come riferimento dello spettro di fondo. I dati presentati sono rappresentativi per tutte le repliche presente in seguito, in quanto la procedura di sintesi si è dimostrata robusta e riproducibile. La cisteamina è una molecola piccola che presenta una bassa sezione d'urto Raman, per questo motivo i suoi segnali caratteristici sono pochi e deboli. Malgrado ciò si possono identificare in Figura 21 le bande a 408, 662, 866 e 1109 cm⁻¹, ascrivibili rispettivamente a $\delta(\text{CCN})$, $\nu(\text{C-S})$, $\nu_s(\text{C-C-N}) + \delta(\text{CSH})$ e $\delta(\text{CCH})$ della cisteamina.⁶⁷

L'adesione dell'acrilammide-1,10-fenantrolina al substrato per via della polimerizzazione radicalica è il passaggio che conduce a variazioni spettrali molto evidenti (Figura 32), dal momento che la fenantrolina è una molecola con una estesa aromaticità e ben attiva al Raman. L'attribuzione di quest'ultima trae beneficio dagli spettri di riferimento presentati nel paragrafo 3.3.

Il decorso della reazione tra anidride acrilica e PhenNH₂ è stato verificato grazie alla raccolta dati precedentemente svolta dal laboratorio ospitante e consiste nell'analisi dello spettro di massa della miscela di reazione dopo la polimerizzazione:

L'analisi ESI/TOF ci consente di concludere che la reazione è avvenuta con successo, poiché si nota il picco dello ione molecolare di Phen-NH-Acr (5-acrillammido-fenantrolina) che è il prodotto desiderato.

Si notano inoltre degli addotti di Phen-NH-Acr con H₂O, con Et₃N e anche con Phen-NH₂ e degli oligomeri di PAA (acido poliacrilico) di 7 e 8 unità, a riprova del fatto che l'anidride acrilica idrolizza ad acido acrilico, il quale può a sua volta polimerizzare prima della reazione con AIBN a 70°C.



m/z	Attribuzione
196.09	Phen-NH ₂
250.10	Phen-NH-Acr
268.11	Addotto Phen-NH-Acr + H ₂ O
351.22	Addotto Phen-NH-Acr + Et ₃ N
445.18	Addotto Phen-NH-Acr + Phen-NH ₂
499.19	PAA (n = 7)
635.24	PAA (n = 8)

Figura 33- (Sopra) Spettro di massa ESI/TOF della miscela di reazione tra AA e PhenNH₂, da misure già disponibili. (A sinistra) attribuzione dei principali valori di m/z.

3.5.2 Substrati funzionalizzati con il Phen libera (approccio 1)

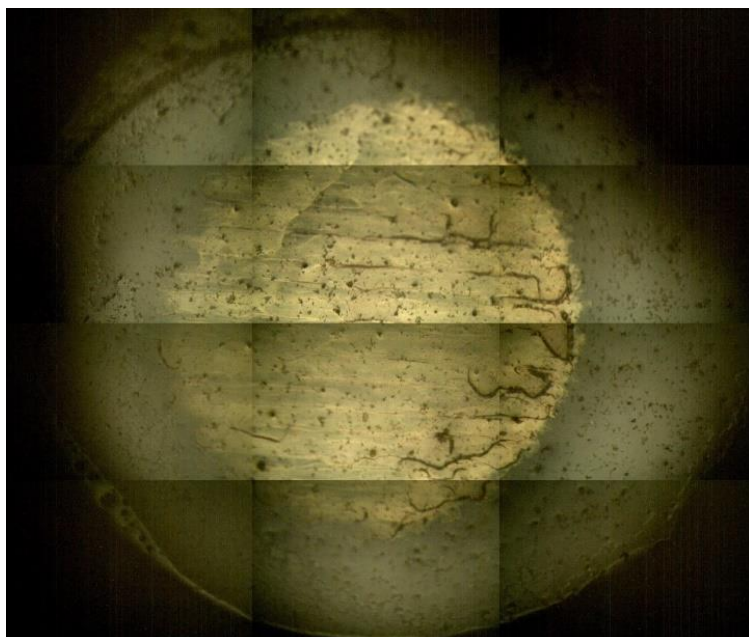


Figura 34-Montaggi fotografici ottenuti con obiettivo 10X del substrato 2.2 utilizzato per la mappa di imaging prima e dopo la reazione con soluzione di Fe²⁺

I substrati prodotti seguendo l'approccio numerato come 1 prevedono che la fenantrolina venga legata al substrato in modo "libero", ovvero senza alcuna orientazione imposta. È opportuno infatti ricordare che la complessazione con il Fe²⁺ prevede una ben definita orientazione spaziale di ben 3 molecole di fenantrolina attorno al medesimo centro metallico. L'arrangiamento delle fenantroline fatte aderire al substrato stampato secondo approccio 1, potrebbe quindi inibire una corretta ri-orientazione delle stesse in fase di formazione del complesso. Per verificare questa eventualità, e comunque andare a caratterizzare l'efficacia del substrato funzionalizzato nel sequestrare e rilevare cationi di Fe²⁺, si sono acquisite misure Raman in circa 20 zone diverse del substrato prima e dopo averlo posto a contatto con una soluzione di Fe²⁺. Questi dataset spettrali sono poi stati elaborati con l'ausilio di algoritmi sviluppati in Matlab dal laboratorio ospitante.

In questo caso l'applicazione della soluzione di sale di Mohr sul substrato non ha evidenziato variazioni spettrali rispetto alle misure acquisite prima del trattamento. In Figura 35 vengono infatti riportati i profili spettrali ottenuti dalla media di tutte le misure acquisite prima e dopo il trattamento con Fe²⁺. Dal confronto con i riferimenti si evince che una ipotetica interazione con gli ioni Fe²⁺ non ha portato a nessun nuovo contributo rispetto al profilo della sola Phen-NH₂, tanto che risulta probabile che questa interazione non sia avvenuta affatto. Come citato in precedenza, l'orientazione casuale delle fenantroline funzionalizzate al substrato secondo l'approccio 1 potrebbe precludere la buona formazione del complesso ferroina.

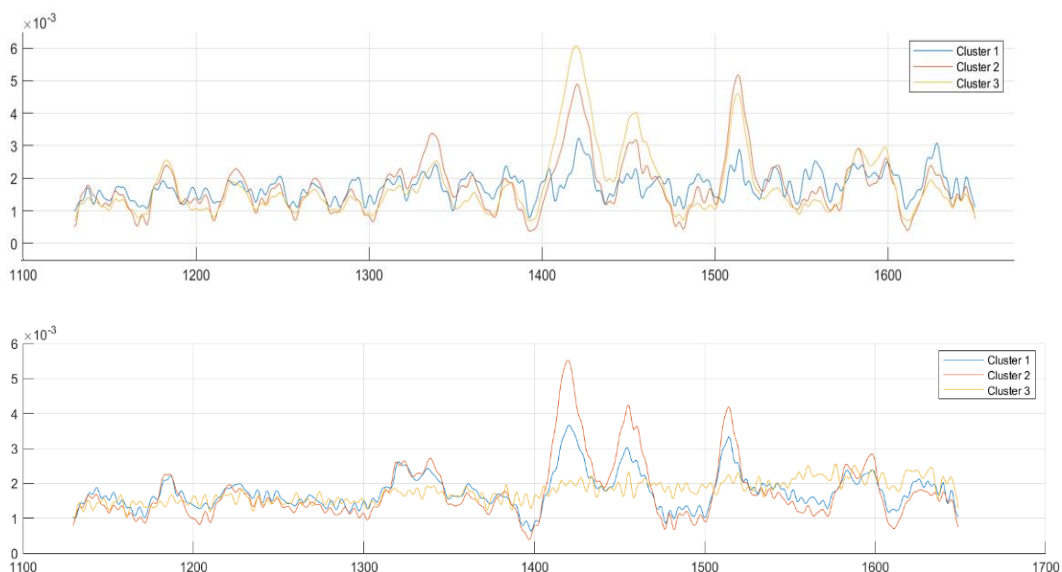


Figure 35 (sopra) e 33 (sotto)- Spettri rappresentativi della cluster analysis svolta sulle mappe SERS dello spot 2.2 prima (sopra) e dopo (sotto) l'applicazione della soluzione di Fe(II) sul substrato.

3.5.2 Substrati funzionalizzati con il Phen pre-complessata (approccio 2)

In questo caso si vuole perseguire una linea di sintesi ispirata ai molecular imprinted polymers, ovvero dove venga predisposta una tasca della giusta conformazione per ricevere poi l'analita di interesse. La Phen-NH₂ non viene quindi polimerizzata come libera in soluzione, ma viene prima complessata con ioni Fe²⁺, quindi la polimerizzazione avviene attorno ad un complesso già formato, congelando di fatto la struttura della tasca una volta rimosso il Fe²⁺ dal suo interno.

I substrati funzionalizzati in questo modo presentano quindi i segnali SERS caratteristici della ferroina-NH₂ e sono caratterizzati con mappe Raman a risoluzione di 20 μm comprendenti ciascuna circa 1000 spettri. L'analisi di questi grandi dataset avviene grazie a routine Matlab precedentemente sviluppate dal laboratorio ospitante. Per valutare la corrispondenza con gli spettri di riferimento verrà utilizzata la correlazione di Pearson, per la quale un valore prossimo ad 1 identifica una perfetta corrispondenza con lo spettro di riferimento.

Mappe SERS dello spot 1.3

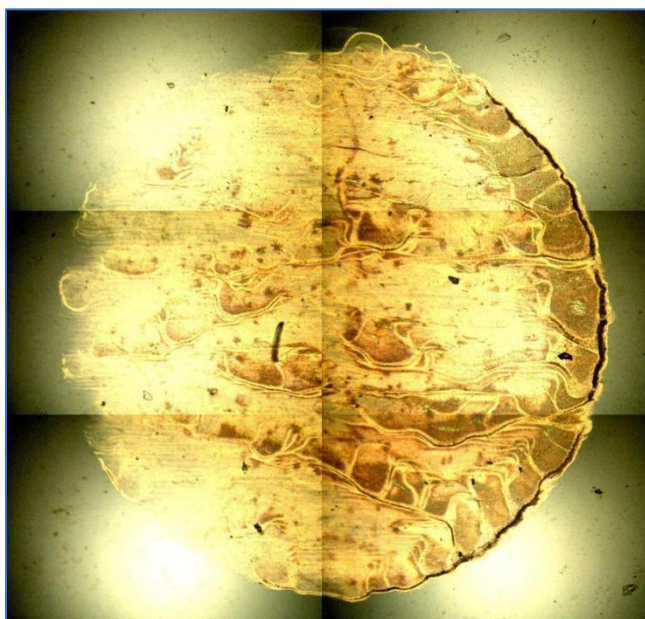


Figura 36- Montaggio ottenuto con lente 10X del substrato 1.3 utilizzato per la mappa SERS di imaging

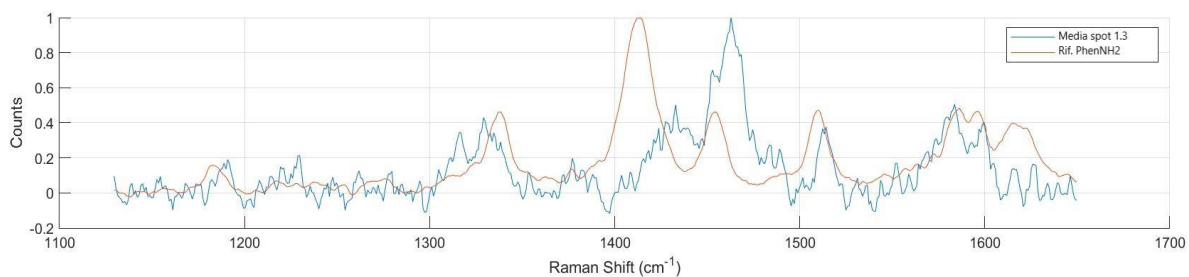
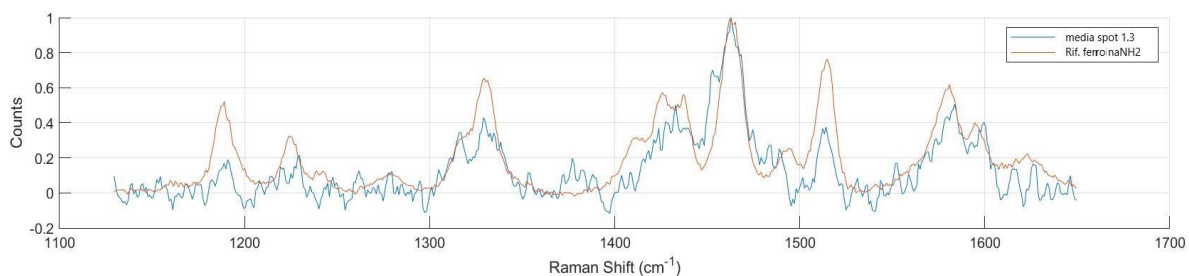


Figura 17-Spot 1.3: Confronto tra lo spettro medio registrato durante la mappa SERS e gli spettri di riferimento della FerrioinaNH₂ (sopra) e della PhenNH₂ (sotto)

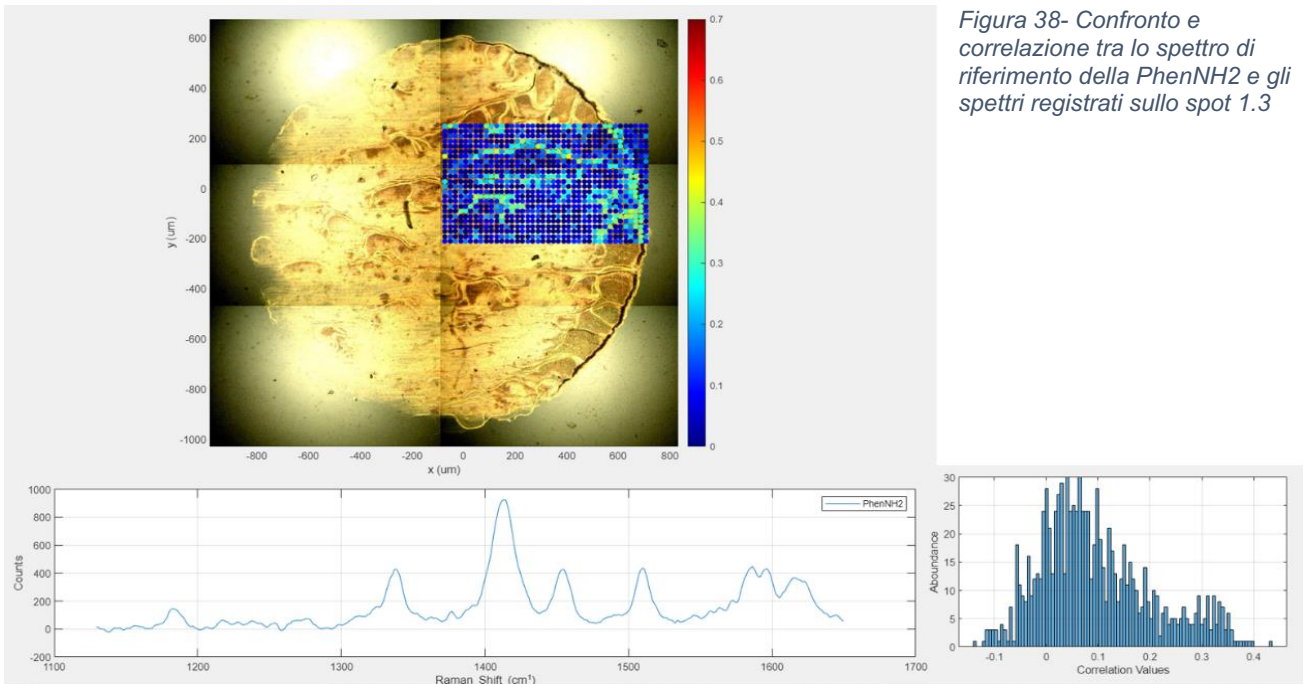


Figura 38- Confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della PhenNH2 e gli spettri registrati sullo spot 1.3

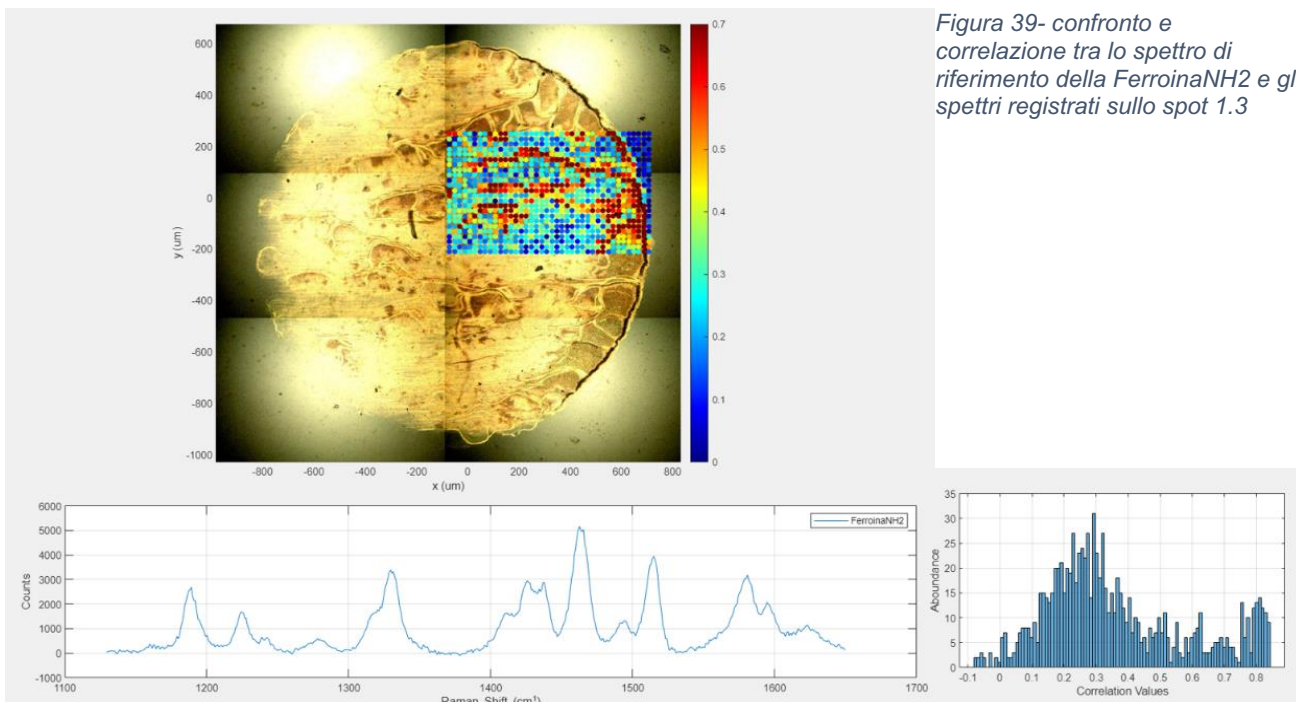


Figura 39- confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della FerroinaNH2 e gli spettri registrati sullo spot 1.3

Le figure sopra riportate ben delineano una chiara corrispondenza degli spettri acquisiti da substrato 1.3 con il riferimento ferroina-NH2. In particolare, in figura 39 si evince come alcune zone del substrato risultino particolarmente SERS attive, fornendo spettri più chiari ed intensi che vengono quindi meglio identificato tramite correlazione di Pearson con la Ferroina-NH2. Si ritiene che queste zone siano

disomogeneità della stampa a getto d'inchiostro, ovvero zone più ricche di nanoparticelle di Au.

Mappa SERS dello spot 2.3

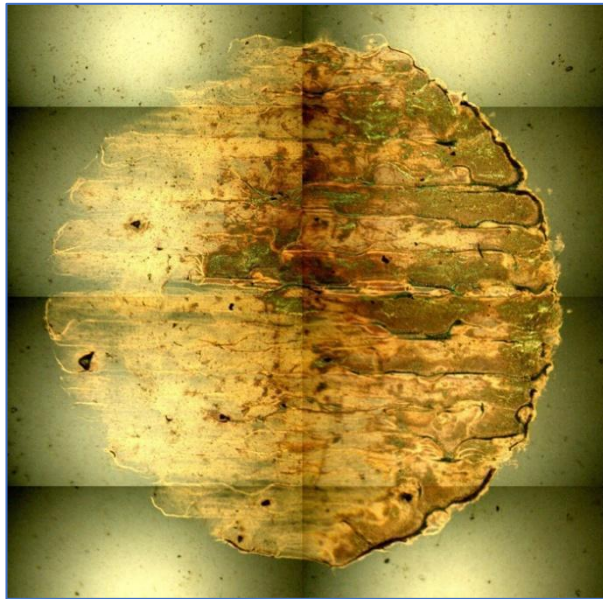


Figura 21 Montaggio utilizzato per la mappa di imaging, ottenuto con lente 10X del substrato 2.3

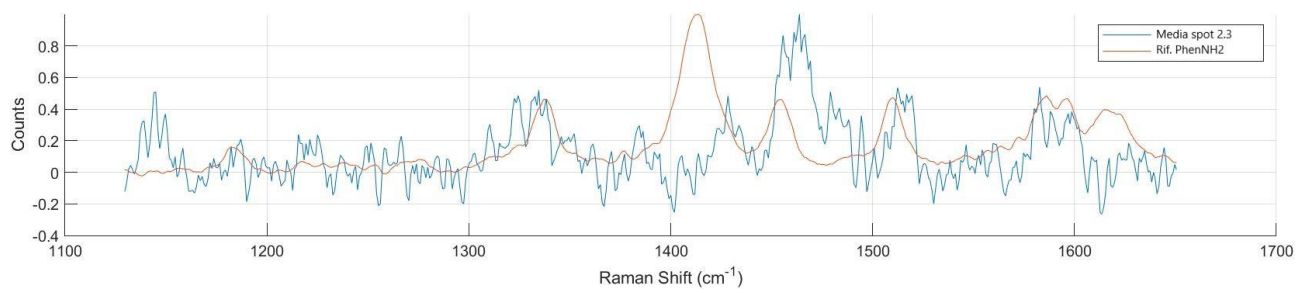
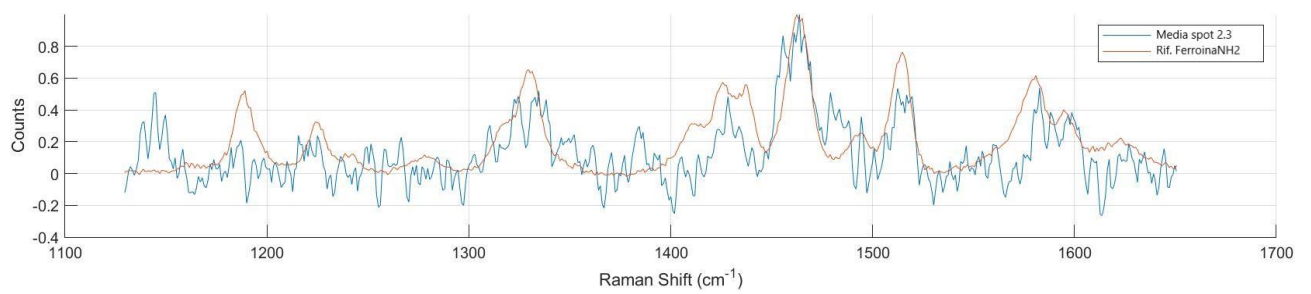


Figura 42-Spot 2.3: Confronto tra lo spettro medio registrato durante la mappa SERS e gli spettri di riferimento della FerrioinaNH₂ (sopra) e della PhenNH₂ (sotto)

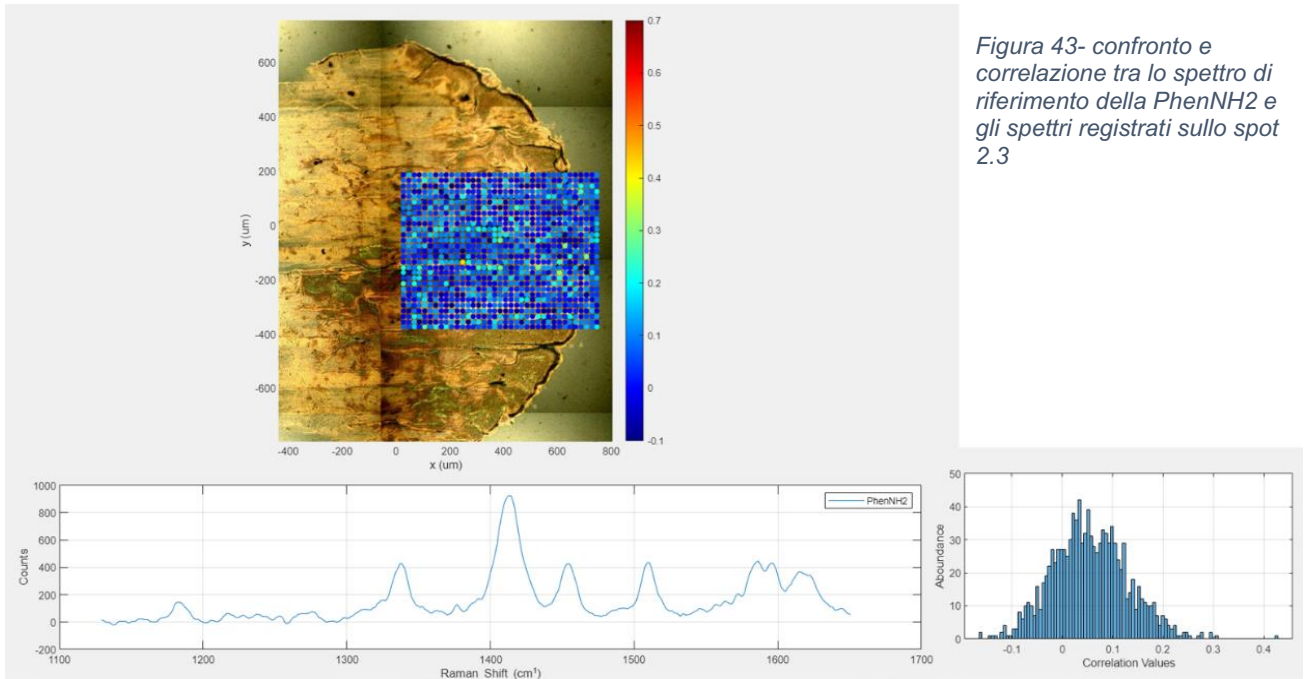


Figura 43- confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della PhenNH2 e gli spettri registrati sullo spot 2.3

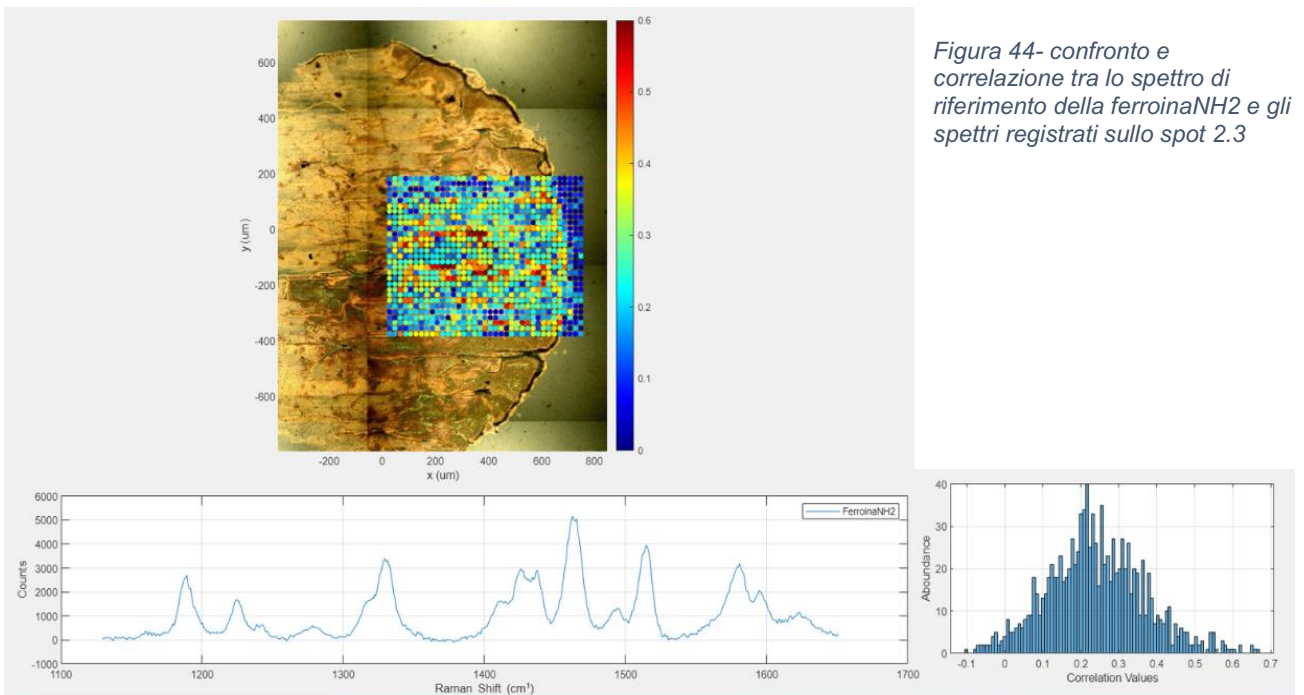


Figura 44- confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della ferroinaNH2 e gli spettri registrati sullo spot 2.3

Anche in questo caso le misure portano a concludere l'inequivocabile presenza di segnali riconducibili alla ferroina-NH2.

Mappe SERS di imaging dello spot 1.6

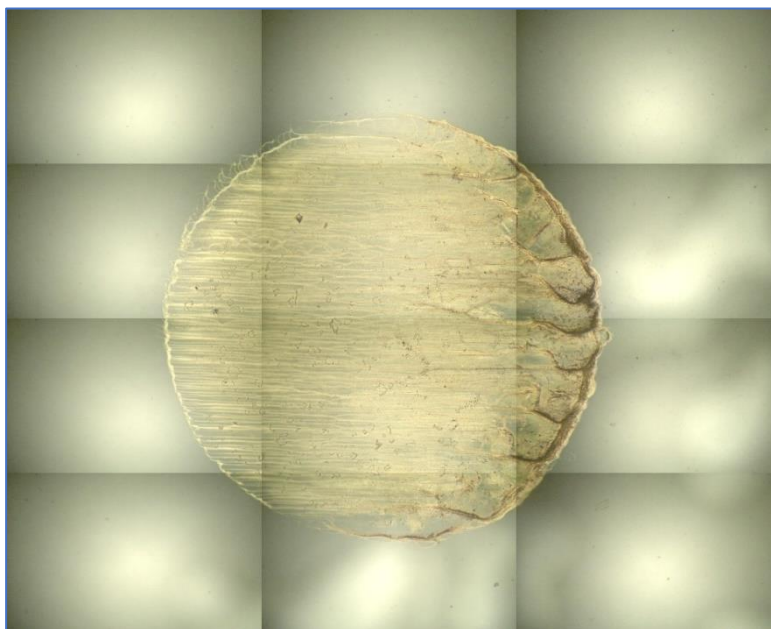


Figura 45-Montaggio utilizzato per la mappa SERS di imaging ottenuto con ingrandimento 10X del substrato 1.6

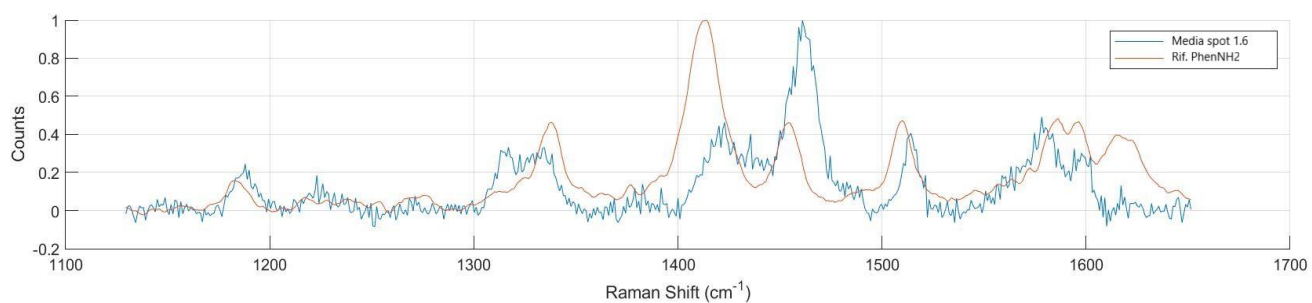
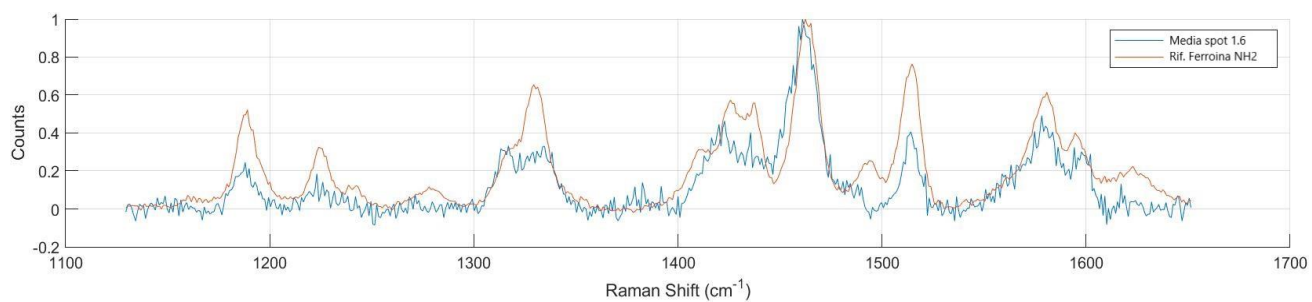


Figura 46-Spot 1.6: Confronto tra lo spettro medio registrato durante la mappa SERS e gli spettri di riferimento della FerrioinaNH2 (sopra) e della PhenNH2 (sotto)

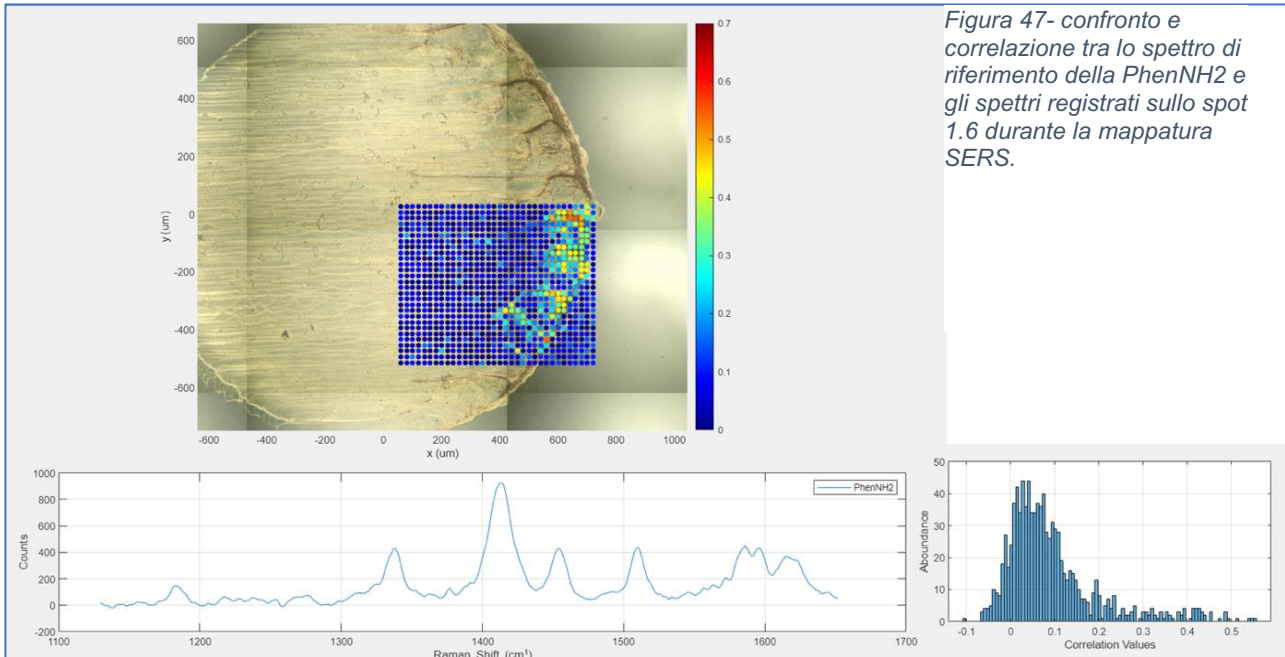


Figura 47- confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della PhenNH2 e gli spettri registrati sullo spot 1.6 durante la mappatura SERS.

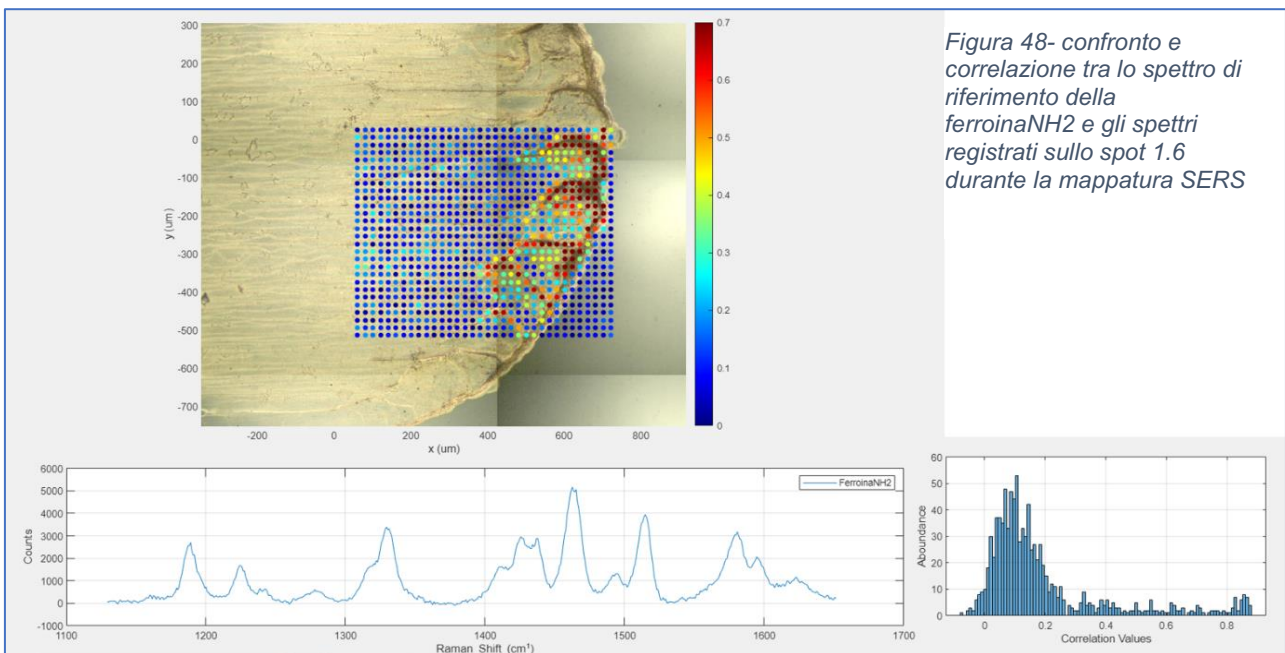


Figura 48- confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della ferroinaNH2 e gli spettri registrati sullo spot 1.6 durante la mappatura SERS

In questo substrato appare con maggiore evidenza la disomogeneità del substrato stampato, dove il maggior accumulo di inchiostro a base di nanoparticelle di Au porta a segnali nettamente più intensi sulle zone perimetrali del substrato. L'attribuzione è, anche in questo caso, per la Ferroina-NH2.

Mappe SERS dello spot 2.6

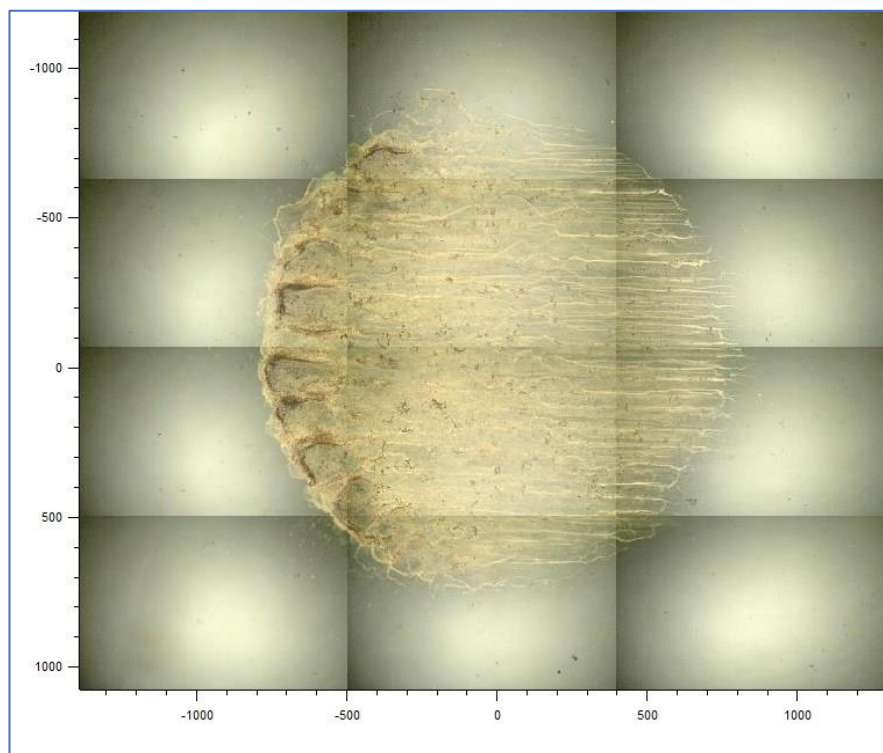


Figura 49- Montaggio utilizzato per l'acquisizione della mappa SERS di imaging dello spot 2.6, scala in micrometri

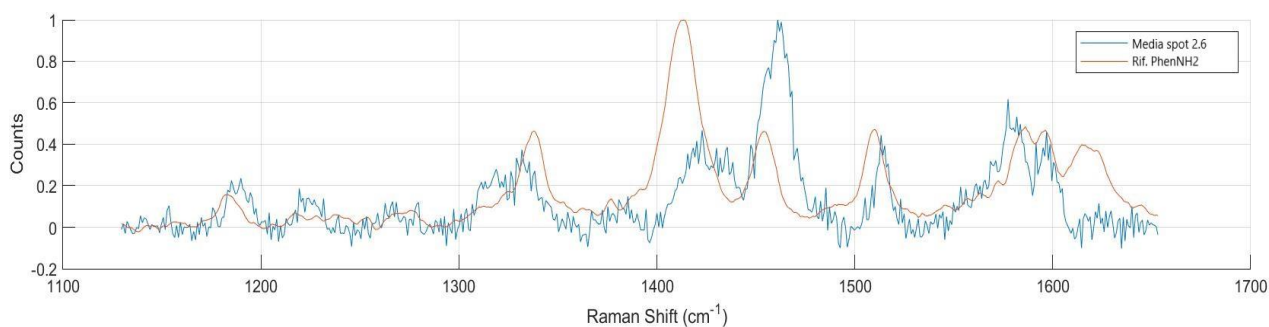
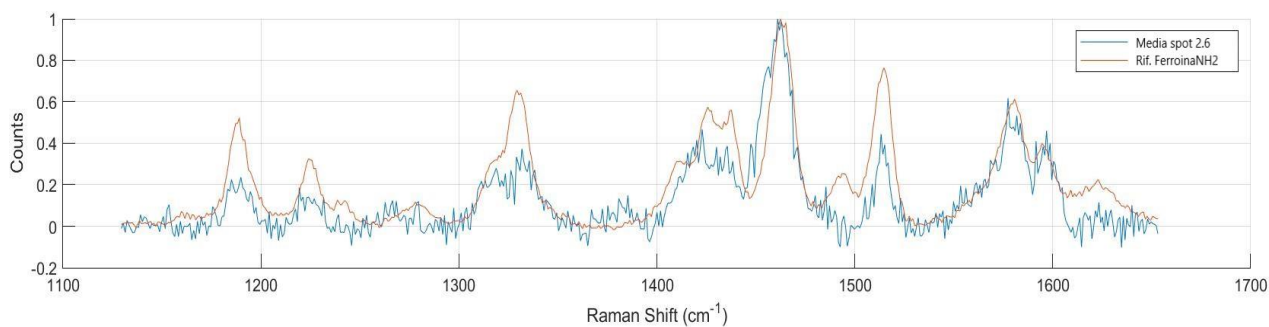


Figura 50-Spot 2.6: Confronto tra lo spettro medio registrato durante la mappa SERS e gli spettri di riferimento della FerroinaNH2 (sopra) e della PhenNH2 (sotto)

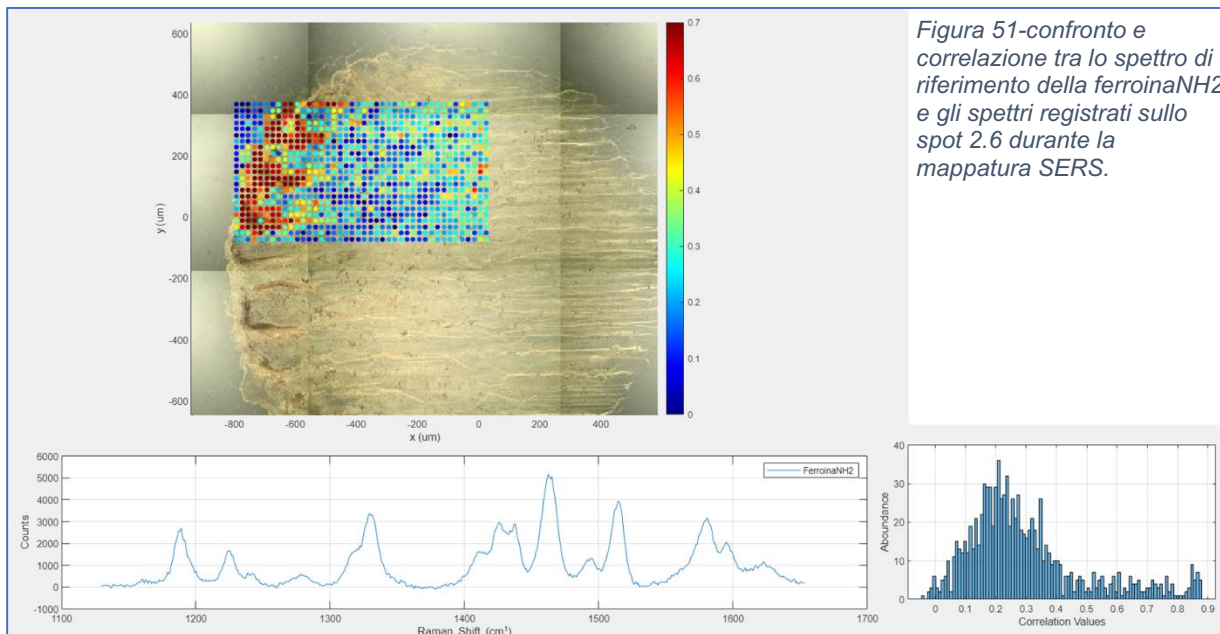


Figura 51-confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della ferroinaNH₂ e gli spettri registrati sullo spot 2.6 durante la mappatura SERS.

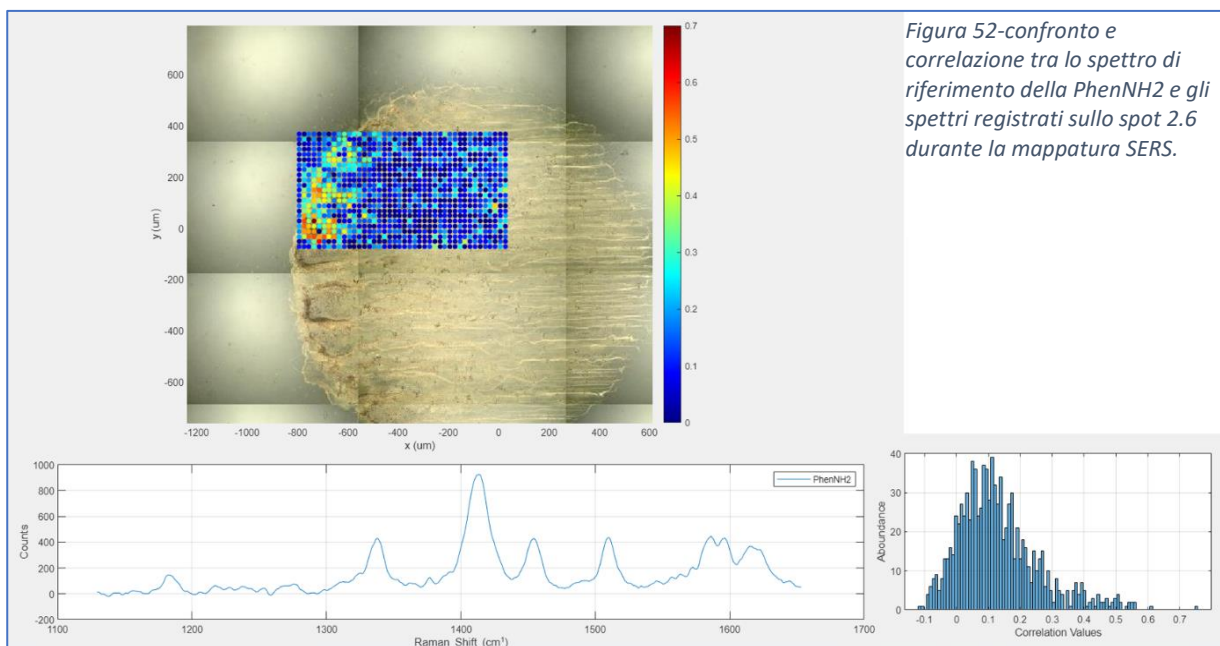


Figura 52-confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della PhenNH₂ e gli spettri registrati sullo spot 2.6 durante la mappatura SERS.

Per il substrato 2.6 valgono le stesse considerazioni già riportate in precedenza: segnali più intensi sulle zone perimetrali del substrato e attribuzione dei segnali come derivanti da Ferroina-NH₂.

3.5.3 Analisi dei substrati 1.3 e 2.3 dopo la reazione con EDTA

Affinché i substrati prodotti con l'approccio 2 risultino efficaci ed utilizzabili come sensori per la cattura e rilevazione di specie cationiche, è di fondamentale importanza che si possa ripristinare la tasca di fenantrolina come "vuota" e pronta ad accogliere un nuovo catione. Per questo motivo verranno sfruttate le conoscenze acquisite lungo il paragrafo 3.4 per quanto concerne la reversibilità del complesso ferroina quando in presenza di un eccesso di EDTA.

Mapa SERS dello spot 1.3 dopo il trattamento con EDTA

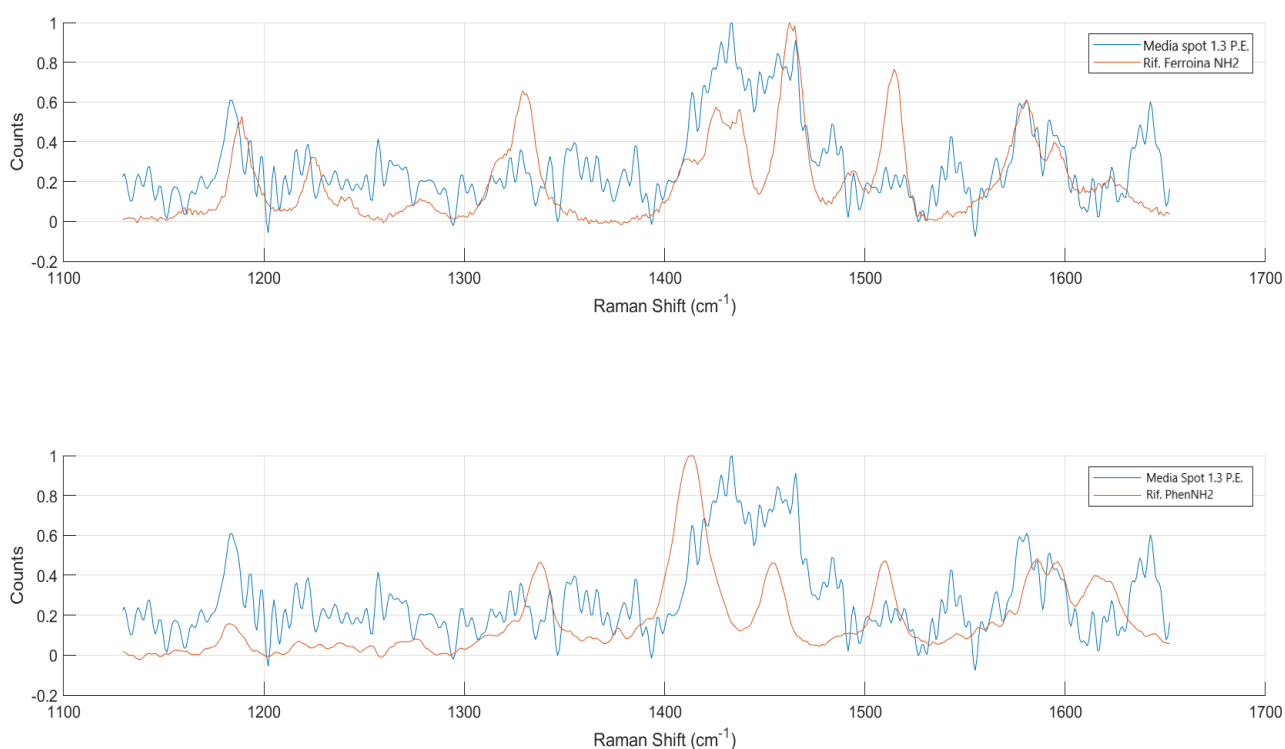


Figura 33-Spot 1.3: Confronto tra lo spettro medio registrato durante la mappa SERS dopo la reazione con EDTA e gli spettri di riferimento della FerroinaNH₂ (sopra) e della PhenNH₂ (sotto)

In figura 53 ci si riferisce agli spettri con la sigla "P.E." per specificare che si riferiscono a misure successive alla reazione con EDTA (**Post EDTA**). È stato infatti riportato lo spettro medio della mappa SERS, di 1000 spettri, sovrapposto agli spettri di riferimento di PhenNH₂ e FerroinaNH₂

Si riporta di seguito, per comodità la figura 38, già inserita precedentemente, riferita alle analoghe misure **prima** del trattamento con EDTA:

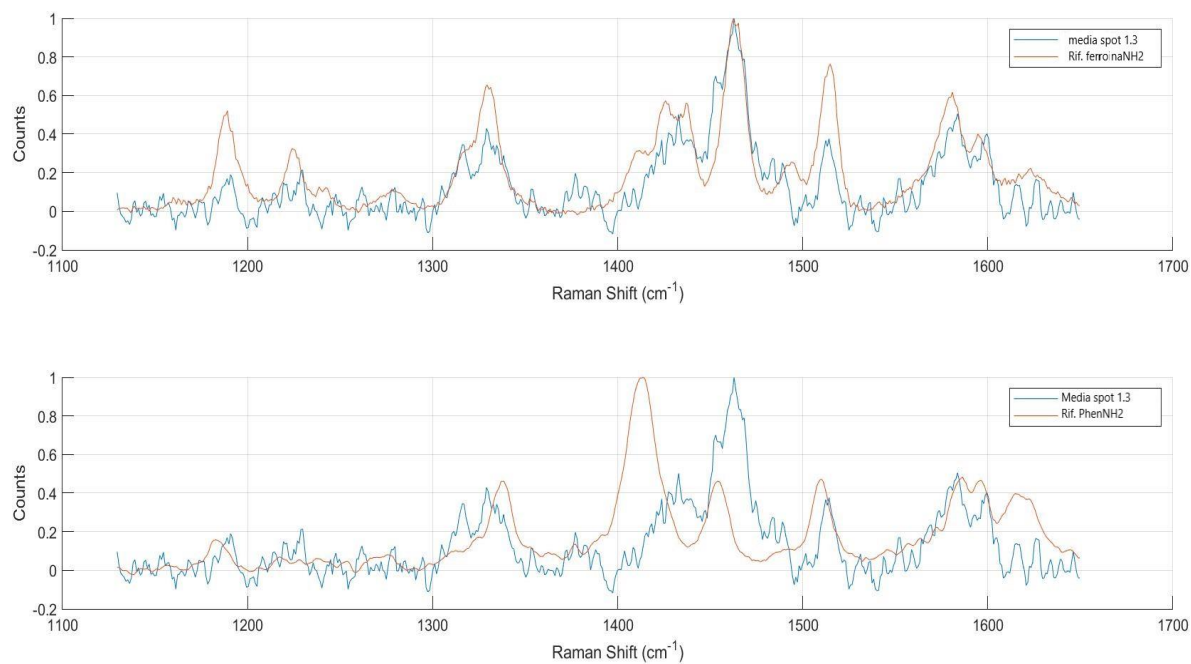


Figura 37-Spot 1.3: Confronto tra lo spettro medio registrato durante la mappa SERS e gli spettri di riferimento della FerroinaNH₂ (sopra) e della PhenNH₂ (sotto)

Si riporta la mappa SERS degli score di correlazione registrata dopo il trattamento con EDTA 0.01M:

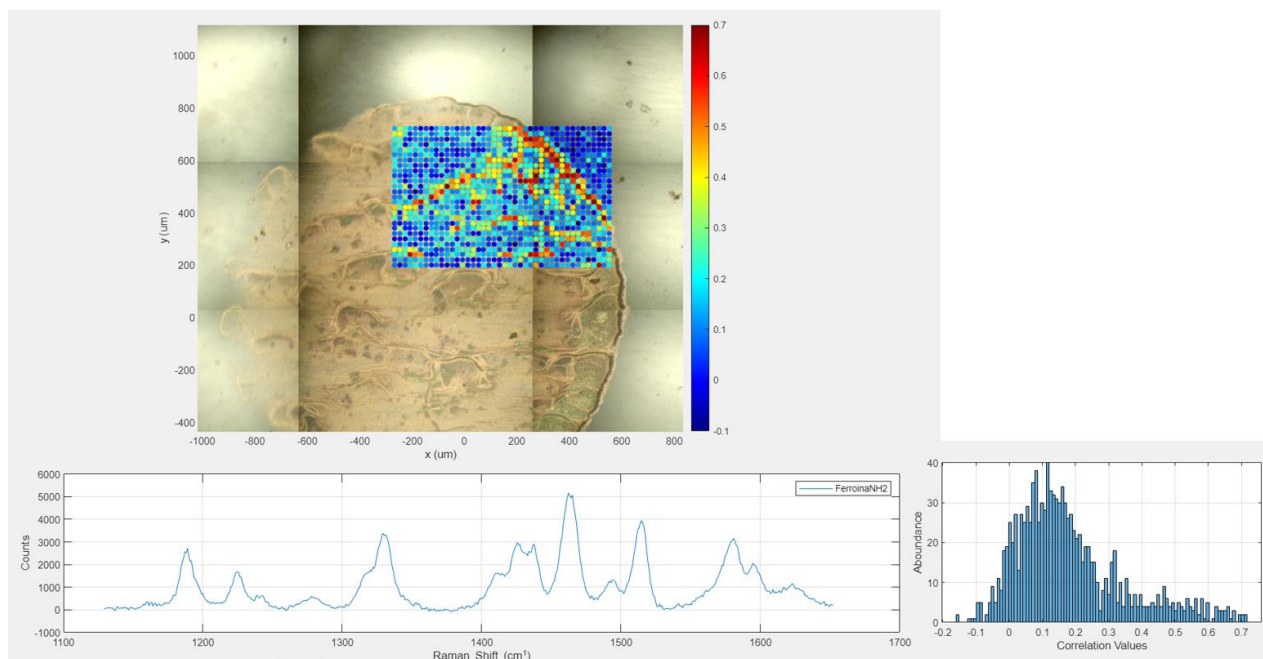


Figura 54-confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della ferrioinaNH2 e gli spettri registrati sullo spot 1.3 durante la mappatura SERS svolta **dopo** la reazione con soluzione di EDTA 0.01 M

Per facilità di confronto, si ripropone la mappa SERS analoga a quella in figura 54, ovvero figura 39, svolta prima della reazione con EDTA 0.01M

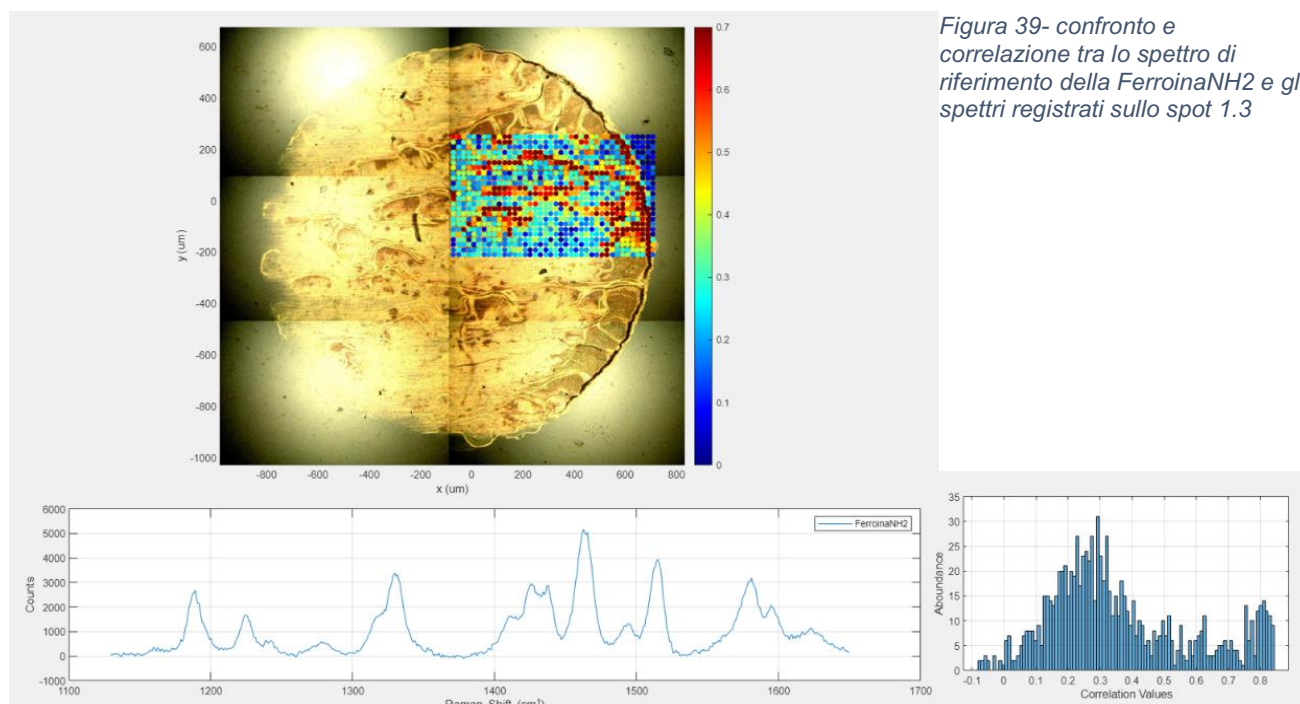


Figura 39- confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della FerrioinaNH2 e gli spettri registrati sullo spot 1.3

Le figura 37 e 53 mostrano gli spettri media ottenuti dalla mappa Raman dello spot 1.3 prima e dopo il trattamento con EDTA. Questo avviene immergendo il substrato in una soluzione di EDTA 0.01 M in tampone ammoniacale per 12 ore. Dopodiché il substrato viene prelevato, sciacquato con acqua bidistillata ed analizzato al Raman. Da queste misure si possono riconoscere delle variazioni tra prima e dopo il trattamento con EDTA. Grazie al confronto con gli spettri di riferimento si può riconoscere come il profilo caratteristico della FerroinaNH₂, presente nel substrato prima del trattamento con EDTA, evolva verso un profilo molto meno coerente e più simile ad uno spettro intermedio tra FerroinaNH₂ e Phen-NH₂, osservato in precedenza per i substrati prodotti con l'approccio 1. Le mappe per correlazione di Pearson di cui in Figura 39 e 54 confermano quanto discusso pocanzi, fornendo ulteriori informazioni circa la distribuzione spaziale di questi segnali.

Mapa SERS dello spot 2.3 prima e dopo il trattamento con EDTA

In questo paragrafo sono presentati i dati riguardanti le misure sul substrato 2.3 in modo del tutto analogo al precedente paragrafo.

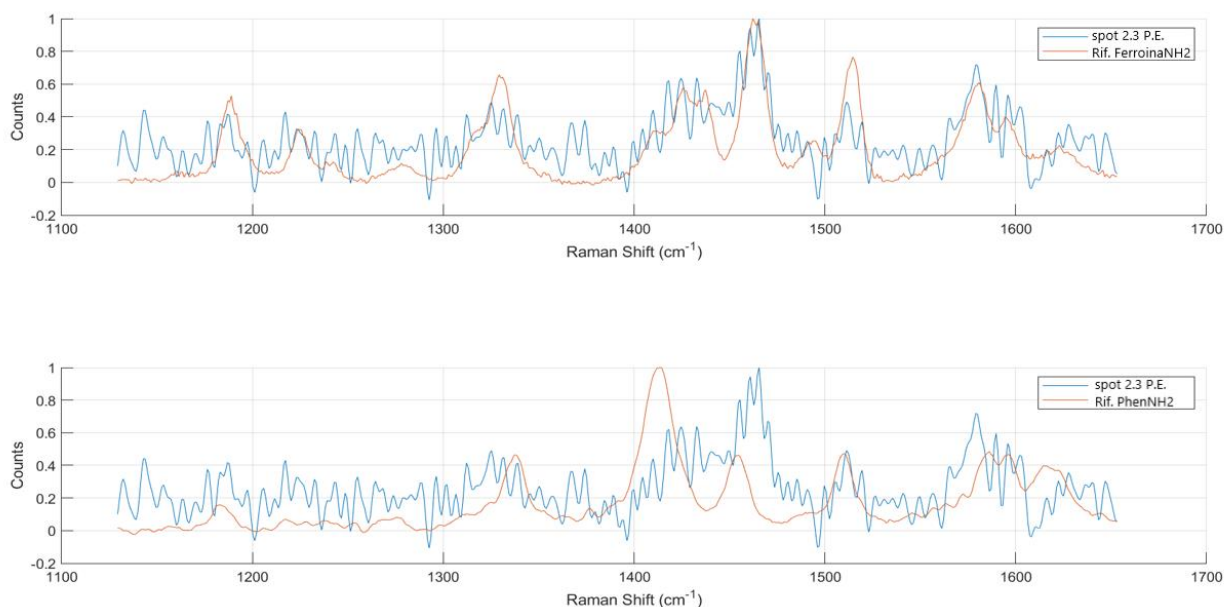


Figura 55-Spot 1.3: Confronto tra lo spettro medio registrato durante la mappa SERS dopo la reazione con EDTA e gli spettri di riferimento della FerrouinaNH₂ (sopra) e della PhenNH₂ (sotto)

Anche qui si ripropongono le misure precedenti per confronto (Figura 41 paragrafo 3.5.2):

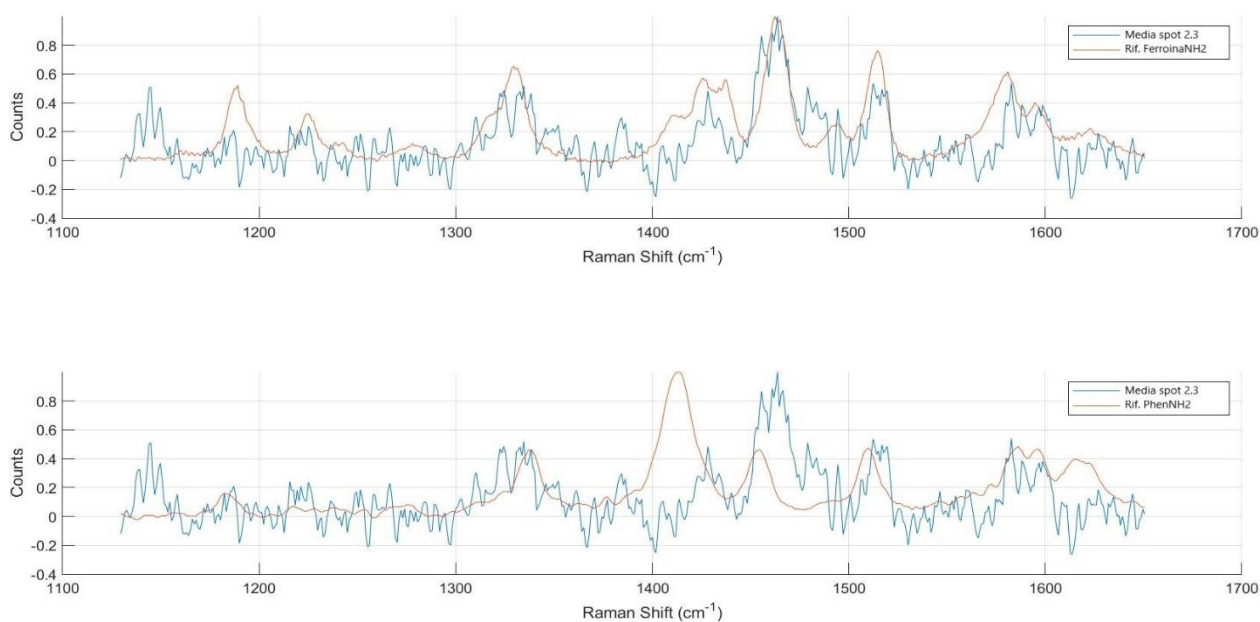


Figura 41-Spot 2.3: Confronto tra lo spettro medio registrato durante la mappa SERS e gli spettri di riferimento della FerrouinaNH₂ (sopra) e della PhenNH₂ (sotto)

come al paragrafo precedente, di seguito il confronto tra le mappe prima (figura 42) e dopo la reazione con EDTA 0.01M

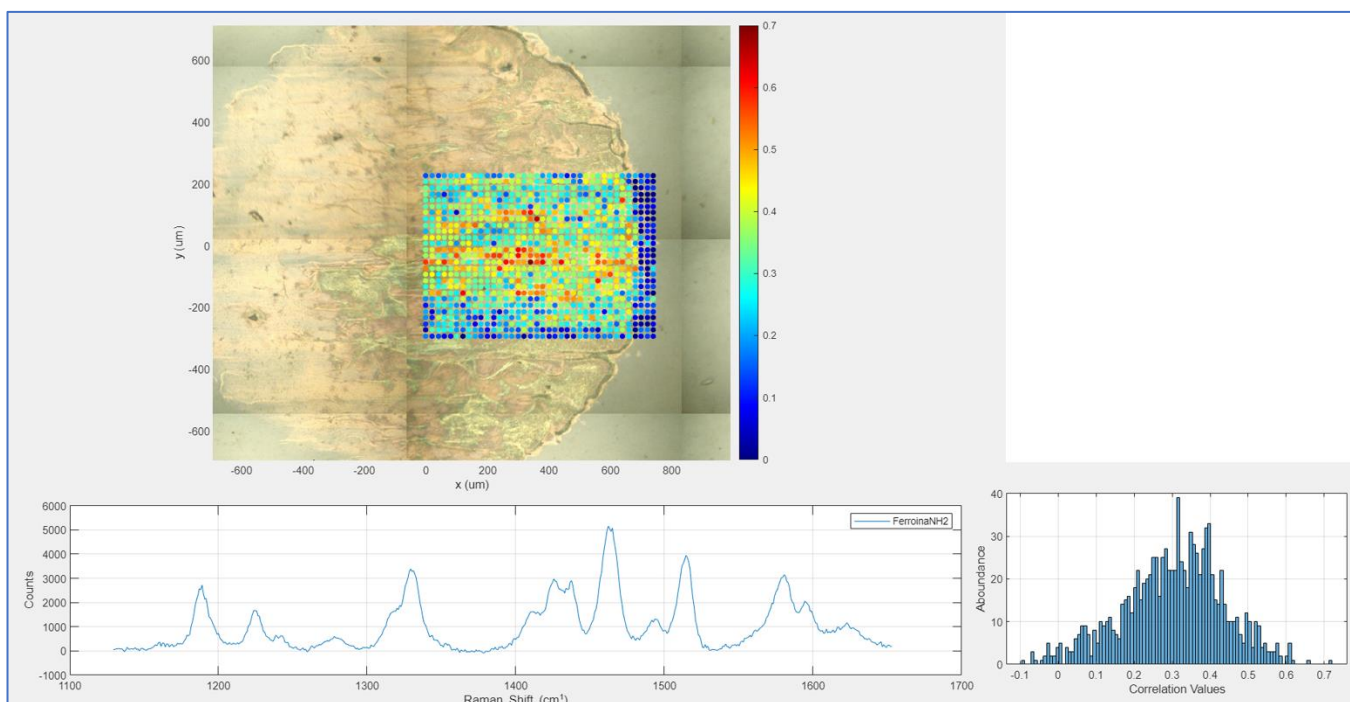


Figura 56-confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della ferrioxalateNH2 e gli spettri registrati sullo spot 2.3 durante la mappatura SERS svolta **dopo** la reazione con soluzione di EDTA 0.01 M

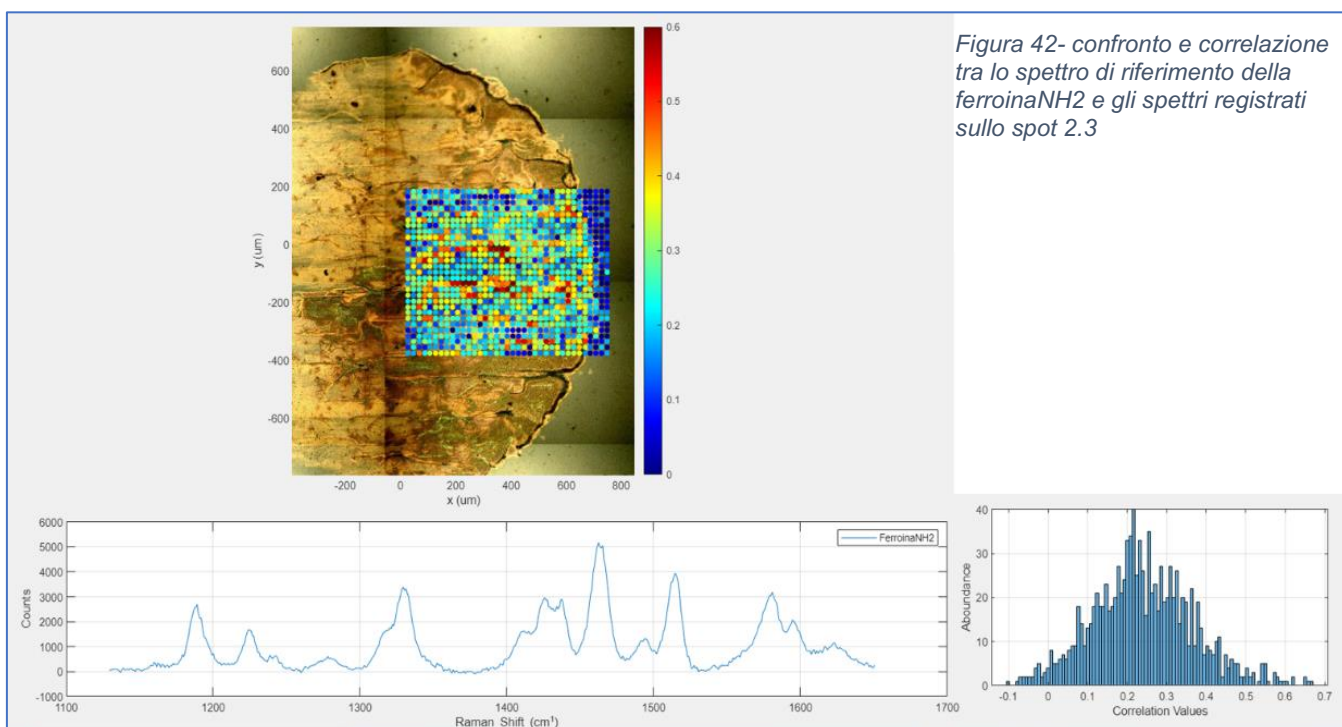


Figura 42- confronto e correlazione tra lo spettro di riferimento della ferrioxalateNH2 e gli spettri registrati sullo spot 2.3

Gli spettri SERS acquisiti da spot 2.3 sono coerenti con quanto già visto in spot 1.3, ovvero il trattamento con EDTA si dimostra efficace nel convertire una impronta spettrale tipica delle ferrioina-NH₂ in una sicuramente dissimile e ibrida, indice di una trasformazione subita del complesso.

4 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Alla luce dei risultati illustrati al capitolo 3.5 si possono formulare alcune considerazioni riguardo le misure che hanno interessato i substrati di nanoparticelle d'oro funzionalizzati.

- In primo luogo, è da sottolineare la riproducibilità della produzione via inkjet printing e funzionalizzazione dei substrati. Infatti, sono stati prodotti numerosi campioni tra loro indipendenti, tutti trattati alla stessa maniera se non per la variante che caratterizza “approccio 1” rispetto ad “approccio 2”. Gli spettri SERS relativi a ciascuno di questi sono sempre chiari ed intensi, sintomo che la specie Phen-NH₂, o ferroina-NH₂, ben si lega alla superficie.
- Altra nota importante va dedicata alla centralità della strategia di funzionalizzazione. I due approcci che sono stati intrapresi differiscono principalmente nel momento della formazione del complesso tra il centro metallico e i leganti derivati dalla fenantrolina. Il primo approccio di sintesi, con la PhenNH₂ libera, è stato portato a termine e caratterizzato numerose volte. Tuttavia, i test eseguiti con le soluzioni di Fe²⁺ in acqua per verificare le capacità di complessazione hanno dato sempre esito negativo, sebbene variando notevolmente le condizioni di reazione.

È ragionevole dedurre che il sistema molecolare ancorato alla superficie di nanoparticelle sia troppo vincolato per permettere la reazione, che prevede la formazione di sei legami disposti in geometria ottaedrica e che a sua volta comporta l'avvicinamento e la chelazione di tre molecole di legante per ciascuno ione.

- La funzionalizzazione della superficie eseguita seguendo il secondo approccio, basato sui principi degli *imprinted polymers*, ha visto la formazione del complesso prima della polimerizzazione che ancorasse il sistema molecolare alla superficie plasmonica. Questo *modus operandi* si è dimostrato efficace ed ha interessato i substrati di cui al paragrafo 3.5.2 ovvero gli spot stampati

1.3, 2.3, 1.6 e 2.6. Il profilo spettrale tipico della ferrioinaNH₂ è stato sempre rinvenuto con alte correlazioni in questi campioni. La stabilità termodinamica della ferrioinaNH₂ è risultata sufficiente da mantenere il complesso integro anche durante una polimerizzazione radicalica. Quest'ultimo aspetto non era affatto scontato ed è uno degli aspetti più problematici approcciandosi alla produzione di materiali *imprinted*.

- Come sottolineato lungo il testo, i substrati prodotti secondo l'approccio 2 sarebbero di fatto inutilizzabili se la tasca di fenantrolina non potesse essere liberata dal Fe²⁺ utilizzato per la sintesi, rendendola quindi pronta ad essere utilizzata come sensore per un ipotetico campione incognito. Per questo motivo è stata studiata la reversibilità della complessazione grazie ad un eccesso di EDTA. Sia in soluzione, che su substrato, questa strategia si è rivelata efficace. La ferrioina polimerizzata sulla superficie plasmonica viene riconvertita in fenantrolina libere nell'arco di alcune ore. Si può quindi affermare che l'obiettivo di produrre una superficie *imprinted* abbia avuto successo.

I risultati ottenuti durante il mio internato di tesi e presentati in questo elaborato sono nel loro complesso da ritenere estremamente interessanti e promettenti.

Superfici plasmoniche sono state ottenute con alta riproducibilità grazie alla tecnica dell'inkjet printing, utilizzando un inchiostro da me prodotto a base di nanoparticelle di Au ottenute per ablazione laser in soluzione.

Questi substrati sono stati poi funzionalizzati mediante un processo di polimerizzazione radicalica al fine di avere dei residui di fenantrolina liberi sulla superficie per una futura applicazione come sensore per metalli pesanti.

Si è visto che per ottenere una superficie utile allo scopo è necessario prevedere una organizzazione spaziale delle fenantroline sulla superficie. Questo lo si ottiene con un approccio *imprinted*.

Per concludere il progetto è ora necessario applicare queste superfici alla rilevazione di metalli da campioni incogniti. Oltre al Fe^{2+} , verranno vagliati anche il Cu, Ni, Sn ed altri per valutarne la capacità legante e quella di distinguere il tipo di metallo grazie alla peculiare impronta spettrale Raman.

In conclusione, la spettroscopia Raman amplificata da superfici è una tecnica che possiede un grande potenziale per applicazioni in ambito analitico che saranno ulteriormente indagate nei prossimi anni.

Il lavoro svolto in questi mesi e qui presentato vorrebbe inserirsi in quest'ottica offrendo un approccio empirico che ha affrontato problematiche trasversali alle aree della chimica, dalla formulazione dell'inchiostro colloidale di nanoparticelle, ai test di sequestro in soluzione.

Lungo il percorso per l'ottenimento dei substrati finiti, infatti, si è potuta sperimentare l'ablazione laser come un metodo semplice veloce ed efficace per produrre una soluzione stabile nel tempo di nanoparticelle d'oro in soluzione acquosa, facilmente ripetibile ed ecosostenibile, non servendosi di solventi diversi dalla semplice acqua deionizzata.

La stampa inkjet su vetro, anch'essa argomento cardine del progetto, si è rivelata essere una procedura affidabile, caratterizzata da tutti i vantaggi tipici delle operazioni automatizzate: elevata riproducibilità, fonti di errore umano molto ridotte e potenziale scalabilità del processo. Il tutto mantenendo un'estrema versatilità legata alla geometria di stampa completamente personalizzabile via software.

I substrati ottenuti a distanza di diversi mesi si sono rivelati resistenti e stabili nel tempo, conservati a contatto con acqua bidistillata.

L'ambito che più si presta a possibili modifiche e sviluppi è la funzionalizzazione delle superfici nanostrutturate che, come visto nei capitoli precedenti è stata provata in

due varianti simili dal punto di vista procedurale ma con importanti differenze concettuali che hanno determinato il successo di un rispetto all'altra.

La 5-ammino-1,10-fenantrolina ha dimostrato di essere un'ottima specie analisi SERS, di complessare efficacemente gli ioni Fe^{2+} , marcando chiaramente le differenze spettrali tra il complesso e il legante libero.

Sicuramente la sintesi attuata può andare incontro a migliorie soprattutto per quanto riguarda la selettività del sistema nei confronti dell'analita e la reversibilità della reazione di complessazione che possa rendere riutilizzabile il futuro sensore.

5 BIBLIOGRAFIA

- (1) G. Xu et al.; Detection of heavy metal ions based on SERS method, *Nanophotonics*, **2021**; 10(18): 4419–4445
- (2) Tchounwou, P. B.; Yedjou, C. G.; Patlolla, A. K.; Sutton, D. J. Heavy metal toxicity and the environment. *EXS* **2012**, 101, 133–164.
- (3) Dalmieda, J.; Kruse, P. Metal cation detection in drinking water, *Sensors* **2019**, 19, 5134.
- (4) P. B. Tchounwou, W. K. Ayensu, N. Ninashvili, and D. Sutton, Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health, *Environ. Toxicol.*, vol. 18, 149–175, **2010**.
- (5) E. M. Nolan and S. J. Lippard, Tools and tactics for the optical detection of mercuric ion *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 50, 3443–3480, **2008**.
- (6) B. B. Rodriguez, J. A. Bolbot, and I. E. Tothill, “Development of urease and glutamic dehydrogenase amperometric assay for heavy metals screening in polluted samples,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 10, pp. 1157–1167, **2004**.
- (7) P. S. Donnelly, Z. Xiao, and A. G. Wedd, Copper and Alzheimer’s disease, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 2, 128–133, **2007**.
- (8) Xiangyang W., Samuel J. C., Guanghua M., Hai Z., Zhen Z. Liuqing Y. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 pp 8244–8259 **2016**.
- (9) Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva: World Health Organization; **2017**.
- (10) H. Li, J. Zhao, S. F. Zhao, and G. F. Cui, Simultaneous determination of trace Pb (II), Cd(II), and Zn(II) using an integrated three-electrode modified with bismuth film, *Microchem. J.*, vol. 168, p. 106390, **2021**.
- (11) H. C. Ma, R. An, L. L. Chen, et al., A study of the photodeposition over Ti/TiO₂ electrode for electrochemical detection of heavy metal ions, *Electrochem. Commun.*, vol. 57, pp. 18–21, **2015**.
- (12) Lucentini L., Patriarca M. per la Sottocommissione del Comitato permanente di Studio sulle Acque del Ministero della Salute (ex art. 9 DM 26 marzo 1991) (Ed.). *Metodi analitici per il controllo delle acque da destinare e destinate al consumo*

umano ai sensi del DL.vo 31/2001 e s.m.i. Metodi chimici. Roma: Istituto Superiore di Sanità; **2019**. (Rapporti ISTISAN 19/7)

(13) X. Y. Liu, K. Yu, H. Zhang, et al., A portable electromagnetic heating-microplasma atomic emission spectrometry for direct determination of heavy metals in soil, *Talanta*, vol. 219, p. 121348, **2020**.

(14) J. Xue, S. F. Gong, X. M. Wang, Y. L. Fan, and X. Li, Determination of Hg, As, Pb, and Cd in orchard soils by sequential injection vapor generation atomic fluorescence spectrometry, *Anal. Lett.*, vol. 45, no. 15, pp. 2257–2268, **2012**

(15) M. R. Knecht and M. Sethi, Bio-inspired colorimetric detection of Hg²⁺ and Pb²⁺ heavy metal ions using Au nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 394, pp. 33–46, **2009**

(16) Ichinoki S., Kitahata N., and Fujii Y., Selective determination of mercury (II) ion in water by solvent extraction followed by reversed-phase HPLC, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 27, no. 11, pp. 1785–1798, **2004**

(17) Atkins P., De Paula J.; *Physical Chemistry, Eighth, Oxford, 2006*.

(18) Larkin P. J.; *Infrared and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation, Elsevier, 2011*

(19) R. R. Jones et al., Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers, *Nanoscale Research Letters* 14:231 **2019**

(20) Langer J. et al., Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering, *ACS Nano* 14 (1), pp. 28-117 **2020**

(21) Guerrini L., Alvarez-Puebla R.A. Surface-Enhanced Raman Scattering Sensing of Transition Metal Ions in Waters *ACS Omega* 6 (2), pp. 1054-1063 **2021**

(22) Reguera, J.; Langer, J.; Jiménez de Aberasturi, D.; Liz-Marzán, L. M. Anisotropic metal nanoparticles for surface enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.*, 46, 3866–3885. **2017**

(23) Blanco-Formoso, M.; Pazos-Perez, N.; Alvarez-Puebla, R. A. Fabrication and SERS properties of complex and organized nanoparticle plasmonic clusters stable in solution. *Nanoscale*, 12, 14948–14956. **2020**

(24) Blanco-Formoso, M.; Pazos-Perez, N.; Alvarez-Puebla, R. A. Fabrication of colloidal platforms for surface-enhanced Raman spectroscopy on optically inert templates. *J. Raman Spectrosc.* DOI: 10.1002/jrs.5989, **2020**

(25) Blanco-Formoso, M.; Pazos-Perez, N.; Alvarez-Puebla, R. A. Fabrication of Plasmonic Supercrystals and Their SERS Enhancing

Properties. ACS Omega, 5, 25485–25492, **2020**

- (26) Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P. Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics. *J. Phys. Chem. B*, 105, 5599–5611 **2001**
- (27) Yang, M., Liamtsau, V., Fan, C., Sylvers, K. L., McGoron, A. J., Liu, G., Fu, F., Cai, Y. Arsenic Speciation on Silver Nanofilms by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.*, 91, pp 8280–8288. **2019**
- (28) Rauf, M.A.; Ikram. M.; *Dyes and Pigments* 52, 183–189, **2002**
- (29) Gonzalez, J.; Najera-Lara, M.; Lopez-Ramirez, V.; Ramirez-Vazquez, J.A.; Segoviano-Garfias, J.J.N.; *Efficient Technologies* 2, 240-246, **2016**
- (30) Brandt, W.W.; Dwyer, F.P.; Gyarfás, E.C.; *J. American Chemical Society*, 959-1017, **1954**
- (31) Irving, H.; Mellor, D.H.; *J. Am. Chem. Soc.* 1002, 5222-5237, **1962**.
- (32) Banks, C.V.; Bystroff, R.I.; *J Am. Che. Soc.* 81, 6153- 6158, **1959**.
- (33) Pahkomova, S.V.; Proskurnin, M.A.; Chernysh, V.V.; Kononets, M.Y.; Ivanova, E.K.; *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 56, 10, 910–917, **2001**.
- (34) McBride, W.A.E.; *Canadian Journal of Chemistry*, 45, **1967**.
- (35) Nahar, N.; Mona, N.P.; Abser, M.N.; *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 46(2), 219-224, **2011**
- (36) Hughes, M.; Macero, D.J.; *Inorganic Chemistry* 13, 11, 2739-2744, **1974**
- (37) Mc Kenzie, H.; *J. Proc. Roy. Soc. N.S.W.* 81, 569-570, **1955**.
- (38) Shalaby, A.A.; Mohamed, A.A.; *Chemical Papers* 74, 3589-3595, **2020**.
- (39) Lee, T.S.; Kolthoff, I.M.; Leusing, D.L.; *J. Am. Chem. Soc.* 70, 7, 2348–2352, **1948**.
Chem. Acta 86, 345-350, **2013**.
- (41) Mudakavi, J.R.; *Analyst* 109, 1577-1579, **1984**
- (42) Swiatkowski, M.; Kruszynski, R.; *Journal of Coordination Chemistry*, **2016**.
- (43) Fullerton, R.; *Retrospective Theses and Dissertations*. 2576, **1959**.
- (44) Turkel, N.; *International Scholarly Research Network Analytical Chemistry*, **2012**
- (45) Quentel, F.; *Electroanalysis* 11,18, 1355-1360, **1999**.
- (46) Davies, N. R., Dwyer, F.P.; *Trans. Faraday Soc.* 49, 180, 1953.80 **1953**

- (47) Rauf, M.A.; Ikram, M.; Ahmad, M.; *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 20:2, 171-180, **2002**
- (48) Godin, M.; Tabard-Cossa, V.; Grütter, P.; Williams, P. Quantitative Surface Stress Measurements Using a Microcantilever. *Appl. Phys. Lett.*, 7, 551–553 **2001**
- (49) Rasheed, T.; Li, C.; Bilal, M.; Yu, C.; Iqbal, H.M. Potentially Toxic Elements and Environmentally-Related Pollutants Recognition Using Colorimetric and Ratiometric Fluorescent Probes. *Sci. Total Environ.* 640, 174–193, **2018**
- (50) Skoog, D.A.; Holler, F.J.; West, D.M. *Fundamentals of Analytical Chemistry*; Brooks/Cole/Thomson Learning: South Melbourne, Australia, **2002**
- (51) Kruse, P. Review on Water Quality Sensors. *J. Phys. Appl. Phys.* 51, 203002, **2018**
- (52) Aragay, G.; Pons, J.; Merkoçi, A. Recent trends in macro-, micro-, and nanomaterial-based tools and strategies for heavy-metal detection. *Chem. Rev.* 111, 3433–3458. **2011**
- (53) Ding, Y.; Wang, S.; Li, J.; Chen, L. Nanomaterial-based optical sensors for mercury ions. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 82, 175–190, **2016**
- (54) Nolan E. M., Lippard S. J., Tools and tactics for the optical detection of mercuric ion, *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 50, pp. 3443–3480, **2008**
- (55) Joseph J. BelBruno *Chemical Reviews* 119 (1), 94-119 **2019**
- (56) Xiaotong Guo, Jinhua Li, Maryam Arabi, Xiaoyan Wang, Yunqing Wang, and Lingxin Chen *ACS Sensors*, 5 (3), 601-619 **2020**
- (57) Culver, H. R.; Peppas, N. A. Protein-imprinted polymers: The shape of things to come? *Chem. Mater.* 29, 5753–5761 **2017**
- (58) P. L. Stiles, J. A. Dieringer, S. N. C. e R. Van Duyne, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.*, vol. 1, pp. 601-626, **2008**.
- (59) D. Long, *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons Ltd, **2002**.
- (60) Crawshaw, A.; Butler, G.B, *J. Am. Chem. Soc.* 80, 5464-5466, **1958**
- (61) K. Kneipp, Surface-enhanced Raman scattering, *Physics Today*, vol. 60, pp. 40-46, **2007**.
- (62) E. Le Ru e P. Etchegoin, *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, Oxford: Elsevier, **2009**.

(63) G. McNay e D. e. a. Eustace, Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications, *Applied Spectroscopy*, vol. 65, n. 8, pp. 825-836, **2011**

(64) E. e. a. Le Ru, Experimental demonstration of surface selection rules for SERS on flat metallic surfaces *ChemComm*, vol. 47, pp. 3903-3905, **2011**.

(65) Sriramam K.; Ramakrishna Ch.; Sreelakshmi J.; *React.Kinet.Catal.Lett*, Vol. 61, No. 1,209-215, **1997**

(66) Litti L., Meneghetti M., *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 21, 15515, **2019**

(67) Riauba, L.; Niaura, G.; Eicher-Lorka, O.; Butkus, E.; *J. Phys. Chem. A* 110, 13394-13404, **2006**.

(68) P. S. Thomas, J. P. Guerbois, G. F. Russell and B. J. Briscoe, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 64, 501–508. **2001**