



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

Interazione tra nanoparticelle plasmoniche ed effetto SERS

Relatore: Prof. Moreno Meneghetti

Laureanda: Maria Ludovica Africano - 1226184

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Nanoparticelle di oro (AuNP)	7
1.2 Proprietà delle nanoparticelle.....	9
1.3 Spettroscopia Raman.....	14
2. PARTE SPERIMENTALE	18
2.1 Sintesi delle nanoparticelle per ablazione laser: apparato strumentale	18
2.2 Aggregazione delle nanoparticelle con NaCl	23
2.3 Funzionalizzazione di AuNP con PEG-SH	24
2.4 Spettri SERS.....	27
3. CONCLUSIONI	31
4. RIFERIMENTI	32

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni ci sono stati notevoli avanzamenti scientifici nella manipolazione e caratterizzazione di materiali di dimensioni nanometriche: la nanoscienza sta evolvendo velocemente e le nanotecnologie hanno consentito di trovare soluzioni a problematiche attuali. I nanomateriali trovano infatti impiego in molti campi come quello biomedicale, ambientale o della conservazione dei beni culturali.

La prima persona a parlare esplicitamente della materia con dimensioni nanometriche, cioè con dimensioni tra quelle subnanometriche delle molecole e quelle micrometriche di oggetti come le cellule, fu il fisico Feynman in una conferenza nel 1959. Egli parlò dell'abilità di manipolare anche singoli atomi e molecole. Feynman riteneva che i problemi della chimica e della biologia sarebbero stati facilmente superati se si riusciva a 'vedere' la materia a livello atomico. Questa riflessione, certamente provocatoria in quanto nell'ambito della chimica gli scienziati operano usualmente 'alla cieca', manipolando oggetti che non sono visibili, è stata sicuramente uno stimolo per tutte le grandi scoperte fatte fino ai nostri giorni, come quelle premiate con il Nobel per la chimica del 2016 per le nanomacchine molecolari ideate da Jean-Pierre Sauvage, Sir James Fraser Stoddart e Bernard Feringa, a cui molto contribuì anche lo scienziato italiano Vincenzo Balzani.

Materiali con dimensioni nanometriche possiedono caratteristiche chimico-fisiche diverse dai rispettivi materiali "bulk" e per questo sono interessanti. Un esempio delle singolari proprietà delle particelle metalliche, che verrà discusso in questo elaborato, sono quelle delle nanoparticelle di oro colloidali (AuNP). Si vedrà, in particolare, come l'interazione tra le nanoparticelle di oro in soluzione influenzi le loro proprietà plasmoniche che a loro volta influenzano i segnali osservati nello scattering Raman, generando quello che viene definito effetto SERS (surface enhanced Raman scattering).

Le nanoparticelle di oro sono state utilizzate poiché possono essere facilmente funzionalizzate e sono stabili. La loro facile funzionalizzazione e la loro stabilità, le rende biocompatibili e perciò ottime candidate per essere utilizzate nel campo della medicina come per la diagnostica, il bioimaging o come drug-carriers.

Dopo un'introduzione dei concetti di base della plasmonica, la tesi descriverà la parte sperimentale con i vari passaggi di funzionalizzazione e di caratterizzazione dei nanosistemi creati.

1.1 Nanoparticelle di oro (AuNP)

1.1.1 Generalità: la storia delle AuNP

Le prime estrazioni di oro risalgono a circa 6000 anni fa e la prima moneta in oro puro viene datata nel 550 a.C. L'oro divenne il metallo universalmente riconosciuto come un oggetto di valore e, pertanto, indispensabile mezzo di scambio e di progresso sociale ed economico. L'oro in forma dispersa in soluzione viene menzionato già da egizi e cinesi nel V secolo a.C., poiché si riteneva avesse delle proprietà curative. Tra i reperti dell'antica Roma sono poi stati ritrovati vetri colorati ottenuti con sospensioni colloidali d'oro, il quale produce una particolare sfumatura di rosso. Un esempio molto noto è la Coppa di Licurgo, custodita al British Museum, e risalente al IV secolo d.C.



Figura 1.1: la Coppa di Licurgo, esposta al British Museum di Londra.^[1]

La coppa (in fig. 1.1), se illuminata frontalmente, appare verde, mentre se illuminata posteriormente il colore risulta rossastro. Questo fenomeno è dovuto alle proprietà plasmoniche delle nanoparticelle che sono incluse nella pasta vitrea e, in particolare, agli effetti di scattering e di trasmissione della luce da parte delle nanoparticelle.

Noto è l'aneddoto dell'alchimista Paracelso che nel XVI secolo, asserì di aver creato una pozione detta *Aurum Potabile*. A questa si ispirò Michael Faraday nel preparare, nel 1857, il primo campione puro di oro colloidale.^[2] Faraday usò fosforo per ridurre una soluzione di cloruro di oro, e fu il primo a capire che il colore era dovuto alle piccolissime dimensioni delle

particelle. La chimica dell'oro era al tempo di Faraday era già nota. L'oro è un metallo dell'undicesimo gruppo, della terza serie dei metalli di transizione, di configurazione elettronica $[\text{Xe}]5d^{10}6s^1$, che lo rende particolarmente stabile visto il completo riempimento degli orbitali d. Seppur metallo nobile, l'oro reagisce efficacemente con lo ione cianuro e con acqua regia (miscela di acido cloridrico e nitrico). Dalla reazione con quest'ultima è possibile ottenere un complesso stabile dell'oro in soluzione, il tetracloroaurato $[\text{AuCl}_4]^-$, un complesso quadrato-planare, la cui riduzione porta alla formazione di nanoparticelle d'oro, se opportunamente stabilizzate.

1.1.2 Sintesi delle nanoparticelle: metodi chimici

La sintesi chimica di AuNP avviene solitamente in soluzione acquosa per riduzione di un sale di oro come $[\text{AuCl}_4]^-$ tramite un agente riducente. Questo approccio è utilizzato in parecchie sintesi. Nel metodo di Turkevitch^[3], ad esempio, si utilizza $[\text{AuCl}_4]^-$ e citrato di sodio come agente riducente e stabilizzante. Questo tipo di sintesi permette di ottenere nanoparticelle d'oro con diametro di circa 15-20 nm. AuNP di dimensioni diverse, tra 16 e 147 nm, sono invece ottenibili con il metodo di Frens^[4]. Per ottenere nanoparticelle sferiche con dimensioni di 1.5-5.2 nm si fa invece ricorso alla sintesi di Brust-Shriffin. Una tecnica interessante è anche il seeding-growth, nel quale nanoparticelle precedentemente preparate con una qualsiasi delle altre sintesi vengono poste in una soluzione contenente un agente riducente e $[\text{AuCl}_4]^-$: le nanoparticelle fungono da centri di nucleazione. Questo metodo è usato spesso per sintetizzare nanorods e permette di controllare le dimensioni delle particelle. ^[5,6,7]

Le sintesi appena menzionate presentano sempre il problema che gli stabilizzanti e i leganti sulla superficie delle AuNP, necessari per controllarne le dimensioni, rendono complicate le successive funzionalizzazioni. Essendo lo scopo di questo lavoro quello di studiare le proprietà plasmoniche di AuNP controllandone l'aggregazione mediante un'opportuna funzionalizzazione, i metodi di sintesi sopra ricordati non erano adatti e le particelle sono state ottenute senza stabilizzanti mediante un metodo fisico quale l'ablazione laser in soluzione (vedi di seguito).

1.2 Proprietà delle nanoparticelle

1.2.1 Proprietà chimico-fisiche

Le nanoparticelle di alcuni metalli appaiono intensamente colorate in modo diverso rispetto al metallo di forma massiva, ad esempio quelle di argento hanno un colore giallo chiaro, quelle d'oro sono rosse e quelle di rame sono di un rosso diverso mentre quelle di platino non sono colorate. La ragione fisica di questo comportamento deriva dalla proprietà delle particelle nota come *plasmone di superficie localizzato* (LSP).

I plasmoni di superficie localizzati sono eccitazioni collettive di elettroni di conduzione che sono localizzate sulla superficie di nanostrutture metalliche. La loro caratteristica è che, rispetto ai plasmoni di un materiale massivo, possono essere eccitati direttamente dalla radiazione elettromagnetica di opportuna frequenza.

Il campo elettrico incidente genera una polarizzazione degli elettroni di conduzione (fig.1.2, fig. 1.3) quando i suoi fotoni entrano in risonanza con l'energia caratteristica del plasmone localizzato. Si genera, su ogni nanoparticella, un dipolo elettrico di grande intensità a cui corrisponde un campo elettromagnetico localizzato nelle vicinanze della superficie delle particelle di qualche ordine di grandezza superiore a quello incidente.^[8] Il grande momento di dipolo associato all'eccitazione plasmonica genera assorbimenti di qualche ordine di grandezza superiori a quelle di usuali molecole organiche.

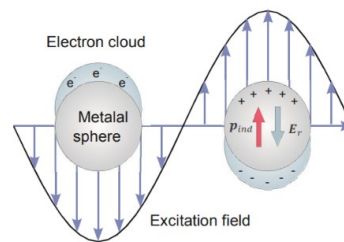


Figura 1.2: Nanosfera metallica posta in un campo EM oscillante. Gli elettroni di conduzione sono spostati in modo da polarizzare la sfera, mentre le cariche positive generate esercitano una forza di richiamo.

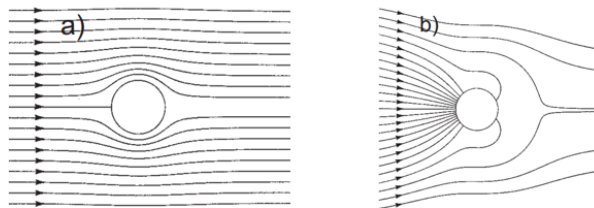


Figura 1.3: Energy flow (vettori con la freccia) intorno ad una nanoparticella di metallo a due frequenze diverse: a) Quando non si eccita alla frequenza della risonanza plasmonica, il flusso è solo leggermente perturbato. b) Quando si eccita il plasmone, il flusso è diretto verso la particella: si ha enhancement del campo.

Le nanoparticelle di oro possiedono una risonanza plasmonica situata nella regione visibile dello spettro e quindi risultano colorate. La LSPR è localizzata a circa 520 nm e questo le fa apparire rosse (assorbono nel verde e vediamo quindi il colore complementare).

La LSPR delle nanoparticelle di oro non è comunque situata sempre alla stessa lunghezza d'onda. Essa dipende dalla forma delle nanoparticelle e in piccola parte dalle loro dimensioni. Inoltre, può essere un po' influenzata anche dal tipo di solvente e/o dal tipo di leganti presenti sulla superficie, poiché essi variano la costante dielettrica dell'intorno.

1.2.2 La teoria di Mie

Il fisico tedesco Gustav Mie nel 1908 fu il primo a razionalizzare la natura del plasmone di risonanza e la sua teoria descrive l'estinzione di nanoparticelle sferiche di dimensioni arbitrarie. L'estinzione è la somma dei contributi di assorbimento e di scattering delle nanoparticelle.

La teoria di Mie ci fornisce una soluzione esatta delle equazioni di Maxwell per il problema di scattering e assorbimento da parte di nanoparticelle sferiche. Il modello si basa sullo sviluppo dei campi elettromagnetici in armoniche sferiche e i modi dei plasmoni di superficie localizzati (LSP) corrispondono a soluzioni dipolari e multipolari della distribuzione di carica generata sulla superficie della nanoparticella.

Nel caso della soluzione al più basso ordine, cioè quella dipolare, si considera che l'interazione della luce avvenga con una particella molto più piccola della lunghezza d'onda della luce incidente, $\lambda \gg 2R$, dove R è il raggio della particella. In questo caso è come se la particella risentisse di un campo elettromagnetico costante nello spazio (fig 1.4). Questa soluzione è detta "quasi-statica".

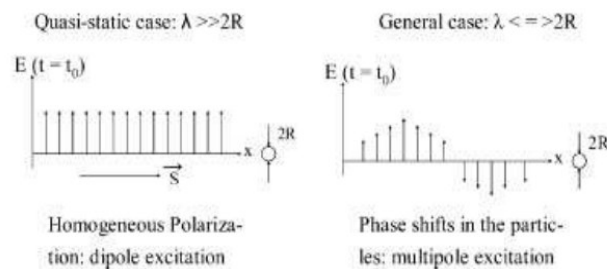


Figura 1.4: A sinistra l'approssimazione quasi-statica: la particella risente di un campo elettromagnetico costante nello spazio. A destra un caso generico: la particella ha un diametro confrontabile con la lunghezza d'onda incidente e l'approssimazione viene meno; si instaurano dei multipoli.

In approssimazione quasi-statica la sezione d'urto totale σ_{ext} è descritta dalla seguente equazione (1):

$$\sigma_{\text{ext}} = \frac{18\pi\epsilon_m^{3/2}V}{\lambda} \frac{\epsilon_2(\lambda)}{[\epsilon_1(\lambda) + 2\epsilon_m]^2 + \epsilon_2(\lambda)^2}$$

Equazione (1): sezione di urto totale per una polarizzazione omogenea.

dove V è il volume della particella, λ è la lunghezza d'onda del campo elettromagnetico, ϵ_m è la costante dielettrica del mezzo e ϵ_1 ed ϵ_2 sono la parte reale ed immaginaria della costante dielettrica del metallo.

La condizione di risonanza si verifica quando $\epsilon_1 = -2\epsilon_m$ (condizione di Froelich), dato che per i metalli questa situazione avviene quando $\epsilon_2 \approx 0$. In questo caso σ_{ext} assume un valore molto alto, che identifica la risonanza plasmonica osservata sperimentalmente. La risonanza risente perciò della costante dielettrica del mezzo in cui sono immerse le particelle, o, in altri termini, del suo indice di rifrazione.

Considerando particelle di forma sferica, al variare delle dimensioni è possibile osservare due effetti:

- 1) *Intrinsic size effect*: si osserva per particelle con dimensioni piccole (di qualche nanometro) ed è dovuto allo smorzamento che subisce l'eccitazione, a seguito dell'interazione degli elettroni con le pareti della particella. Si manifesta con un allargamento del picco di estinzione a cui consegue una diminuzione della sua intensità.
- 2) *Extrinsic size effect*: si verifica per particelle che hanno dimensioni di diverse decine di nanometri ed è dovuto al fatto che in questo caso l'approssimazione dipolare quasi-statica non è più valida. La risonanza dipolare si sposta in questo caso a energie minori ed emergono altre risonanze a più alte energie dovute a polarizzazioni quadrupolari, ottupolari, ... (Fig. 1.5).

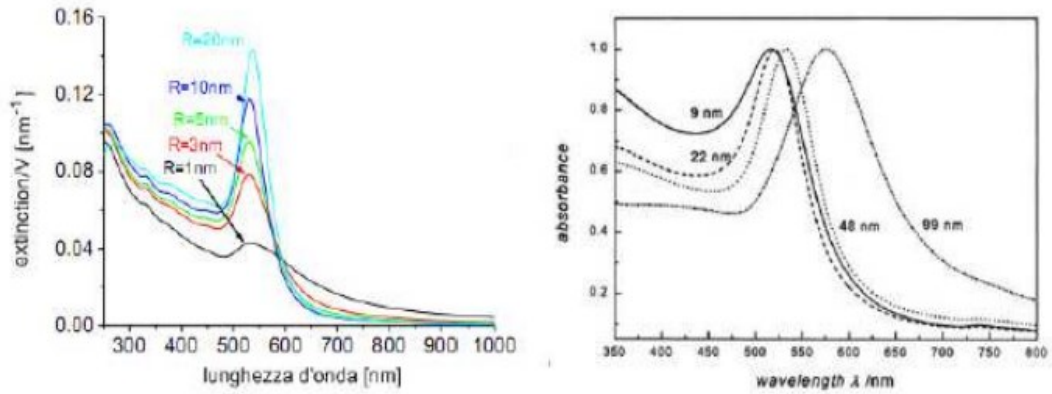


Figura 1.5: Gli effetti dell'intrinsic size effect a sinistra ed extrinsic size effect a destra.

I contributi alla sezione di urto totale dell'estinzione dipendono dalla dimensione delle particelle. Nel caso di particelle di dimensioni fino a poche decine di nm (fig. 1.6), il contributo dell'assorbimento all'estinzione è molto maggiore di quello dello scattering. Nel caso invece di particelle di diverse decine, se non di qualche centinaio di nanometri, il contributo all'estinzione dello scattering diventa sempre più importante (Fig. 1.7).^[9,10]

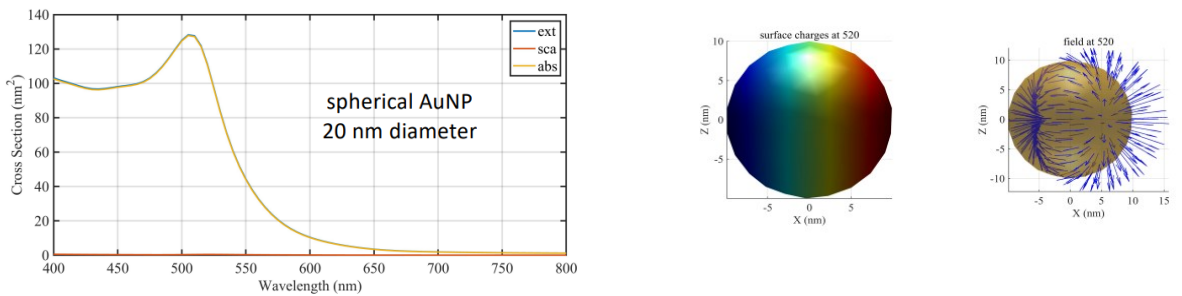


Figura 1.6: (Finite Element Simulations by Boundary Element Method) a sinistra i contributi alla sezione d'urto di una particella di massimo 20 nm di diametro. Il contributo di scattering è minimo. A destra, la particella mostra a 520nm una carica dipolare sulla superficie.

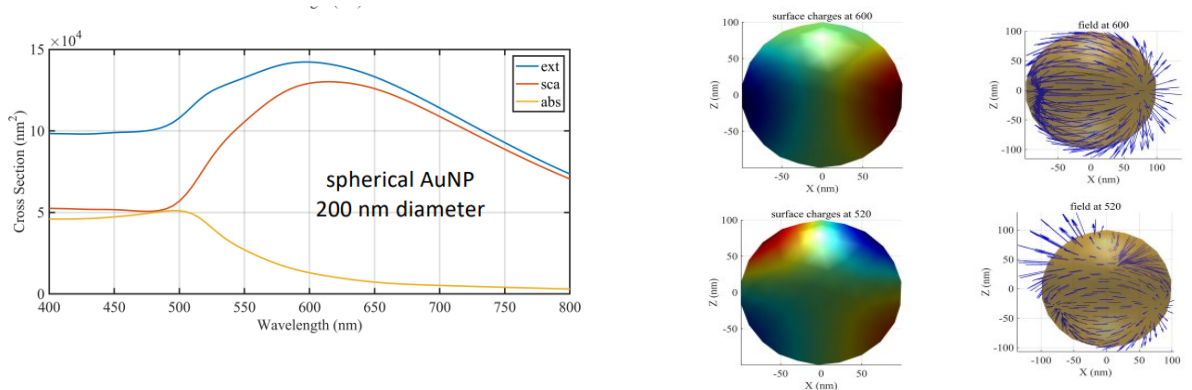


Figura 1.7: (Finite Element Simulations by Boundary Element Method) per nanoparticelle più grandi, il contributo di scattering è nettamente superiore a quello di assorbimento: la particella diventa multipolare e si eccitano più modi dei plasmoni di superficie localizzati (LSP); inoltre, il ritardo degli effetti del campo elettromagnetico attraverso la nanoparticella comporta un allargamento e uno shift del picco plasmonico.

La teoria di Mie mostra che l'assorbimento delle nanosfere d'oro è circa tre o quattro ordini di grandezza superiore rispetto a quello dei più comuni coloranti. Infatti il coefficiente di estinzione molare per particelle di circa 10 nm è dell'ordine di $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, di gran lunga superiore rispetto, ad esempio, al coefficiente di estinzione molare della Rodamina 6G o della Malachite Green che sono entrambi dell'ordine di $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Un esempio visivo di come cambia l'assorbimento delle nanoparticelle a seconda delle loro dimensioni si può osservare nell'immagine di Figura 1.8.^[11-15]

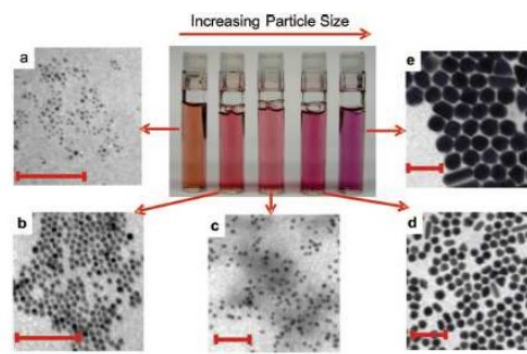


Figura 1.8: Le dimensioni delle nanoparticelle aumentano da (a) ad (e), a cui corrisponde una variazione di colore della soluzione.

1.2.3 Proprietà chimiche e funzionalizzazione

Sebbene non sia molto reattivo, è risaputo che l'oro forma un forte legame con lo zolfo dovuto alla retrodonazione π , nella quale si ha la formazione di un legame σ in cui Au accetta elettroni da S e di un legame π dovuto alla parziale delocalizzazione degli elettroni metallici dagli orbitali occupati dell'oro agli orbitali vuoti dello zolfo.^[16] Sfruttando il legame Au-S è possibile funzionalizzare la superficie delle nanoparticelle.

In questo studio, le nanoparticelle di oro sono state funzionalizzate con PEG-SH (polietilenglicole MW= 5000 Da) (fig. 1.9) e il colorante e SERS reporter Texas Red (Fig. 1.10). In entrambi i casi le molecole sono funzionalizzate con gruppi tiolici.

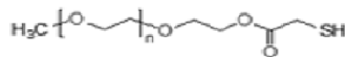


Figura 1.9: metossi-polietilenglicole-tiolato (mPEG-SH), un polimero biocompatibile: serve a stabilizzare stericamente le nanoparticelle aggregate in modo che si preservino nel tempo.

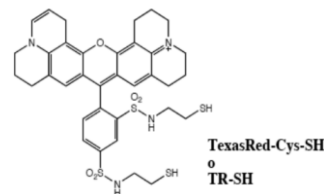


Figura 1.10: Texas Red, un colorante (SERS reporter).

Le funzionalizzazioni delle particelle ottenute mediante ablazione laser in soluzione (vedi in seguito) sono immediate poiché sono particelle non stabilizzate da stabilizzanti, ma da interazioni coulombiane generate dalle cariche native presenti sulle particelle.

1.3 Spettroscopia Raman

Lo scopo della tesi è quello di ottenere spettri Raman amplificati dalla presenza di aggregati di particelle plasmoniche, cioè spettri SERS (surface enhanced Raman scattering).

La tecnica Raman è largamente utilizzata nello studio dei materiali allo stato solido, liquido o gassoso. È una tecnica non distruttiva, che fornisce risposte in tempi brevi, che non richiede particolari condizioni per l'esecuzione della misura e può essere effettuata direttamente sul campione senza nessuna preparazione.

In un esperimento Raman il campione da analizzare viene eccitato da una radiazione elettromagnetica monocromatica proveniente da una sorgente laser. La radiazione polarizza il materiale e la luce scatterata contiene diverse componenti:

1. la componente Rayleigh che proviene da un processo di diffusione elastico che non comporta scambio di energia con il sistema ed ha la stessa energia della radiazione incidente.
2. le componenti Stokes che hanno energie minori e le componenti anti-Stokes che hanno energie maggiori rispetto alla radiazione incidente. Queste componenti provengono da processi di diffusione anelastici, in particolar modo da quelli dovuti all'interazione con i modi vibrazionali del materiale eccitato.

I fenomeni di Raman scattering differiscono da quelli della spettroscopia infrarossa, per le regole di selezione. Le componenti Stokes ed anti-Stokes dipendono dalla variazione della polarizzabilità delle molecole, e avranno perciò intensità diversa da zero solo se è soddisfatta la condizione in equazione (2).

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i}\right)_0 \neq 0$$

Equazione (2): regola di selezione per i fenomeni Raman

Con α si rappresenta la polarizzabilità molecolare e con Q_i le coordinate normali di vibrazione. Secondo la relazione, risultano Raman-attivi solamente i modi vibrazionali per cui si ha una variazione della polarizzabilità. Nello scattering di Rayleigh la molecola si trova inizialmente nello stato vibrazionale $v=0$ dello stato elettronico fondamentale e ritorna allo stesso livello a

fine processo. Nello scattering Raman-Stokes la molecola parte dal livello vibrazionale $v=0$ dello stato elettronico fondamentale, ma ritorna al livello vibrazionale $v=1$ a fine processo. La differenza di energia tra il fotone di eccitazione e quello scatterato corrisponde all'energia del quanto vibrazionale coinvolto.

Nello scattering Raman-Anti Stokes la molecola si trova inizialmente in un livello vibrazionale eccitato $v=1$ e ritorna allo stato $v=0$ a fine processo. La differenza tra energia del fotone iniziale e quello finale risulta essere sempre quella della transizione vibrazionale coinvolta.

La figura 1.11 mostra tutti i diversi casi sopra descritti.

Quando la frequenza del raggio laser incidente è prossima o corrisponde a quella di una transizione elettronica del campione in esame si parla di Raman risonante. In questo caso i segnali rilevati sono più intensi ma la larghezza di banda resta comunque quella tipica di uno spettro vibrazionale.^[17]

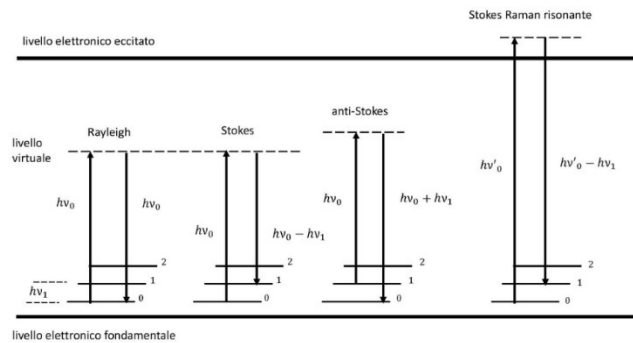


Figura 1.11: schema a livelli che rappresenta i fenomeni di scattering Raman (Stokes e anti-Stokes) e Stokes Raman risonante.

L'informazione che si ottiene in un esperimento di scattering Raman è lo spettro Raman, dove sulle ascisse sono riportate le differenze tra la radiazione incidente e quella scatterata dal materiale (fig. 1.12).

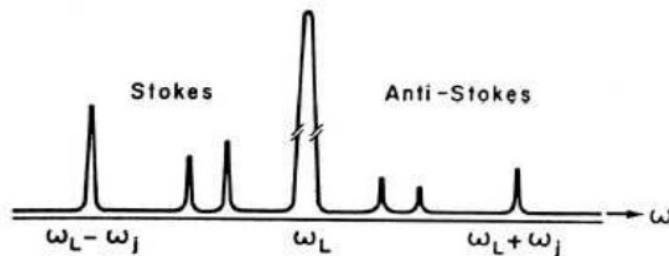


Figura 1.12: spettro Raman; sulle ascisse è riportato il Raman shift con ω_j frequenza del materiale, ω_L frequenza radiazione incidente.

1.3.1 Effetto SERS

Con la spettroscopia SERS (surface enhanced Raman scattering) si può avere un'amplificazione del segnale pari a 10^4 - 10^9 volte rispetto al Raman classico. Esistono due principali meccanismi, tutt'ora oggetto di studio, ritenuti responsabili dell'effetto SERS:

- 1) Meccanismo elettromagnetico
- 2) Meccanismo chimico

Il primo contribuisce alla maggior parte dell'enhancement mentre il secondo vi partecipa solo limitatamente e non risulta essere ben caratterizzato. Per questo motivo si considererà in particolare il meccanismo elettromagnetico.

L'enhancement elettromagnetico si osserva perché il campo elettromagnetico di una radiazione, incidente su una nanoparticella, può essere notevolmente amplificato se i fotoni sono risonanti con l'eccitazione plasmonica. ^[18,19]

La luce del laser eccita il plasmon di superficie che amplifica il campo elettrico attorno alla nanoparticella metallica. Una molecola in prossimità della superficie risente dell'intensità amplificata del campo elettromagnetico e quindi lo scattering Raman di questa molecola risulterà anch'esso amplificato. Il campo di cui risente la molecola nelle vicinanze della nanoparticella è tanto più grande quanto più la molecola è vicina alla superficie della nanoparticella.

L'oro è uno dei substrati più adatti per la spettroscopia SERS perché la condizione di risonanza plasmonica si verifica nel Visibile- NIR e molti dei laser che si usano in spettroscopia Raman hanno lunghezze d'onda in questa regione dello spettro.

Se poi si considera il caso di nanoparticelle vicine, cioè aggregate, l'enhancement risulterà ulteriormente favorito. Questo enhancement del campo elettrico deriva dall'interferenza costruttiva della risonanza plasmonica di superficie delle due particelle e la regione interparticellare in cui si sperimenta questa amplificazione di campo è chiamata "hot spot" (Fig. 1.13).

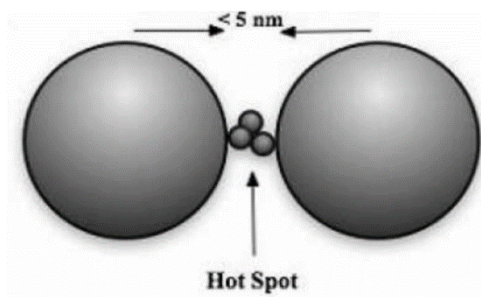


Figura 1.13: rappresentazione di hot-spot tra due nanoparticelle.

Le dimensioni delle nanoparticelle che formano l'hot-spot possono influenzare l'enhancement del SERS e calcoli BEM mostrano che l'amplificazione è elevata quando le due nanoparticelle hanno dimensioni molto simili.^[20] Il fattore determinante per segnali SERS intensi risulta essere comunque la distanza interparticellare, poiché se supera una decina di nm l'effetto SERS è fortemente ridotto.

2. PARTE SPERIMENTALE

In questo lavoro sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro colloidal, in soluzione acquosa micromolare di NaCl, per ablazione laser. Successivamente, queste sono state fatte aggregare utilizzando diverse concentrazioni di NaCl aggiunto alla soluzione iniziale. Infine, le nanoparticelle sono state funzionalizzate con polimero PEG-SH 5000 e il colorante Texas Red, che viene usato come SERS reporter. Tutte le soluzioni sono state caratterizzate mediante spettroscopia UV-Vis-NIR, fittando gli spettri con il programma di fitting Fitspettri, un programma Matlab elaborato nel laboratorio ospitante e basato sull'approccio Boundary Element Method (BEM). Infine, è stato osservato l'effetto SERS delle particelle aggregate con il segnale Raman amplificato del colorante Texas Red.

2.1 Sintesi delle nanoparticelle per ablazione laser: apparato strumentale

La sintesi delle nanoparticelle d'oro è stata ottenuta per ablazione laser in soluzione, utilizzando un laser impulsato, focalizzato con una lente di focale di 40 cm all'interno della cella di ablazione in cui si trovano la soluzione e il target metallico (fig. 2.1). Il laser impiegato è un laser Nd:YAG, (modello YG-981E-10[®] della Quantel), avente come mezzo attivo un cristallo di granato di ittrio e alluminio (yttrium aluminium garnet, Y₂Al₅O₁₂) drogato con ioni Nd³⁺. Per l'ablazione è stata utilizzata la sua riga fondamentale ($\lambda=1064$ nm), con impulsi della durata di 9 ns e una frequenza di ripetizione di 10 Hz; la potenza media impiegata è stata ~ 900 mW, che si traduce in una fluensa di ~ 3 J/cm² sul campione. Quest'ultimo era costituito da un disco di Au 99.9% dello spessore di circa 3 mm, posto qualche mm prima del fuoco del raggio laser. È stata adottata questa accortezza per evitare l'ebollizione locale del solvente a causa dell'eccessiva concentrazione di energia nel punto di fuoco. La cella di ablazione, sul fondo della quale era posizionato il dischetto d'oro, è stata riempita con circa 20 mL di una soluzione 5*10⁻⁵ M di NaCl in acqua bidistillata.

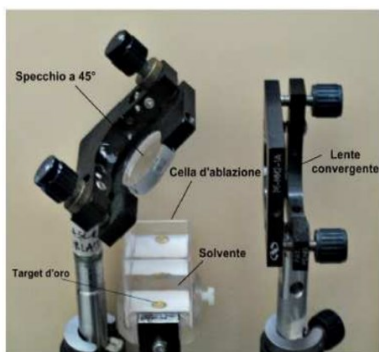


Figura 2.1: apparato strumentale per la sintesi di AuNP per ablazione laser. Il fascio laser proviene da destra e non è visibile ad occhio nudo.

2.1.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro mediante spettrofotometria UV-Vis-NIR

Dopo qualche minuto dall'inizio dell'ablazione è possibile osservare la formazione delle nanoparticelle poiché dal target inizia ad espandersi nella soluzione una nuvola colorata. Con il passare dei minuti la soluzione all'interno della cella di ablazione inizia ad assumere la colorazione rossa tipica delle AuNP (fig. 2.2).

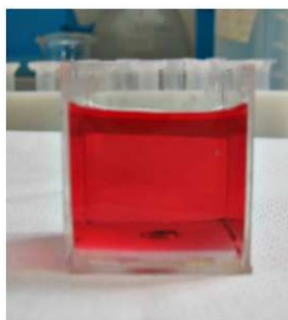


Figura 2.2: soluzione di AuNP colloidali ottenute per ablazione laser

Più volte, interrompendo l'ablazione, è stata valutata la concentrazione delle AuNP mediante spettroscopia UV-Vis-NIR. Lo spettrofotometro utilizzato per raccogliere i dati è un Varian Cary 5, e tutti gli spettri sono stati registrati in cuvetta da 2 mm nel range 200-1000 nm, acquisendo una misura ad intervalli di 1 nm, con una durata di scansione di 600 nm/min. Dall'assorbanza e dalla forma del picco plasmonico è possibile avere una stima della concentrazione e della morfologia delle nanoparticelle. L'ablazione è stata terminata dopo circa 2 ore, e lo spettro raccolto è stato quindi elaborato con il programma Fitspettri, ottenendo l'andamento mostrato in Fig. 2.3.

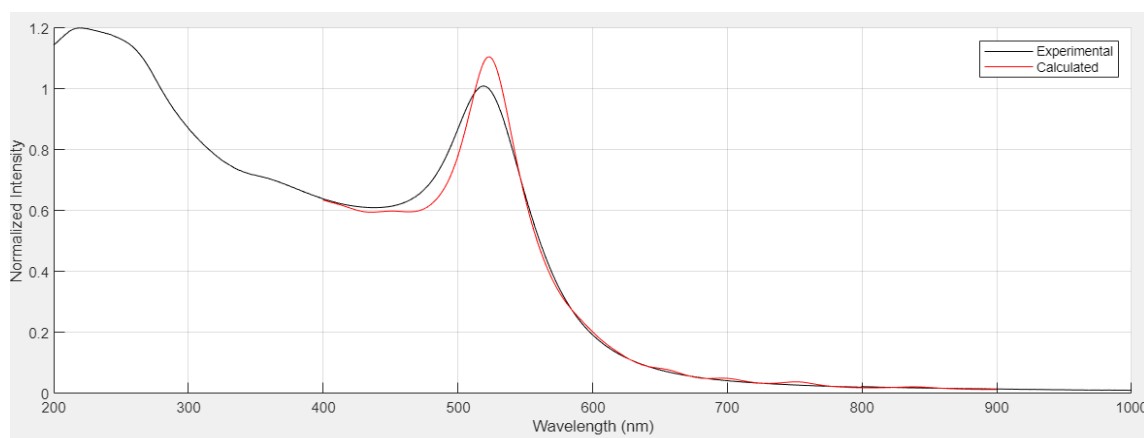


Figura 2.3: confronto tra spettro Uv-vis sperimentale (in nero) e fitting calcolato con il programma Fitspettri (in rosso).

La figura precedente mostra il confronto tra spettro UV-Vis-NIR raccolto sperimentalmente e quello calcolato dal programma. Si ricavano quindi, per la curva sperimentale, i dati riportati in Tabella 1.

Tabella 1: dati ricavati dal fitting dello spettro UV-Vis-NIR delle nanoparticelle sintetizzate

RSS	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	Abs calcolata (b=2mm 520nm)	Concentrazio ne AuNP (mol/L)	Concentrazio ne nanostruttur e (mol/L)	Sezione d'urto molare (nm^2/mol)
0,091692	2.491 E+09	1.10	2,04 E-09	1,40 E-09	1,426 E+27

In tabella: *RSS* è il residual sum of squares del fitting rispetto ai dati sperimentali (il fitting è buono quanto più *RSS* è piccolo); ϵ è il coefficiente di estinzione della soluzione; Abs è l'assorbanza a 520 nm. Da questi dati è stato possibile ricavare il coefficiente di estinzione molare (equazione 3), mentre dalla legge di Lambert-Beer è possibile ricavare la concentrazione molare (equazione 4).

$$\epsilon = \frac{N_A \sigma_{ext}}{\ln 10}$$

Equazione (3): si ricava il coefficiente di estinzione dalla sezione d'urto.

$$A = \epsilon b C$$

Equazione (4): legge di Lambert-Beer.

In figura 2.4 è riportata la distribuzione percentuale dei nanoclusters in soluzione: si osserva che l'83 % di questi sono costituiti da 1 nanoparticella di oro (1 AuNP, blu scuro) e solo una minima parte forma piccoli aggregati di 2-3 nanoparticelle (parti di grafico in blu più chiaro).

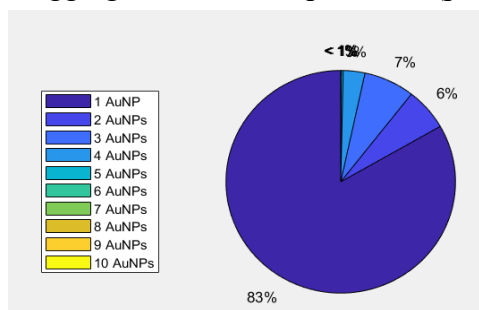


Figura 2.4: distribuzione percentuale dei nanocluster in soluzione.

Dunque, le nanoparticelle di oro sintetizzate sono state caratterizzate mediante spettroscopia UV-Vis-NIR; l'elaborazione dei dati ottenuti dallo spettro ha permesso di verificare che queste risultassero approssimativamente isolate tra di loro, cioè quasi del tutto non aggregate a formare nanoclusters.

2.2 Aggregazione delle nanoparticelle con NaCl

Nel capitolo introduttivo è stata vista l'importanza degli hot spots nella preparazione di nanocomposti per ottenere segnali SERS. Infatti, quando il SERS reporter si trova nel punto intermedio tra due particelle risente di un campo elettrico molto amplificato e il segnale Raman-SERS risulta perciò notevolmente più intenso. Affinché si formino gli hot spots è necessario aggregare le nanoparticelle.

In questo lavoro, l'aggregazione è stata fatta avvenire per semplice aggiunta di soluzioni concentrate di NaCl alla soluzione iniziale. L'aggregazione delle nanoparticelle è accompagnata da un viraggio di colore della soluzione da rosso a grigio-blu scuro (fig. 2.5).



Figura 2.5: a sinistra nanoparticelle non aggregate; a destra particelle aggregate.

Mediante la spettroscopia UV-Vis-NIR è possibile valutare l'aggregazione delle nanoparticelle; infatti, la presenza di aggregati comporta la comparsa di un picco plasmonico a lunghezze d'onda maggiori rispetto a quello a 520 nm caratteristico delle nanoparticelle sferiche e isolate di Au.

In questo studio sono state considerate le aggregazioni che presentano un picco plasmonico a circa 600-700 nm, questo perché una risonanza a lunghezze d'onda superiori è indice di aggregati molto grossi, che non entrano in risonanza con il laser utilizzato che ha una lunghezza d'onda pari a 633 nm. Inoltre, il programma di fitting Fitspettri è in grado di considerare nanocluster che siano costituiti da un massimo di 10 nanoparticelle.

Nel grafico in figura (fig. 2.6) si osservano gli spettri dei campioni riportati in Tabella 2.

In tabella 2 sono riportate le varie soluzioni preparate, con diverse concentrazioni di NaCl, aggiungendo alla soluzione di partenza diversi volumi di NaCl 10^{-1} M. Gli spettri in figura 2.6 (dal campione G0 a G3) mostrano come il picco plasmonico si allarghi all'aumentare della concentrazione del sale in soluzione. Inoltre, i picchi si abbassano: questo perché tra un

2 -PARTE SPERIMENTALE

passaggio e l'altro è possibile perdere delle nanoparticelle, esse possono per esempio restare attaccate alle pareti della provetta o venire accidentalmente prelevate in minima parte durante l'operazione di rimozione del surnatante. Ciò, ovviamente, porta ad una diminuzione degli assorbimenti negli spettri UV-Vis-NIR e quindi il confronto tra questi può risultare più difficile. Allo scopo di ovviare a questo problema, gli spettri sono normalizzati alla lunghezza d'onda di 400nm. Quest'ultima, infatti, è la lunghezza d'onda caratteristica delle transizioni interbanda delle AuNP ed è indice della quantità di oro, aggregato o meno, all'interno del campione.

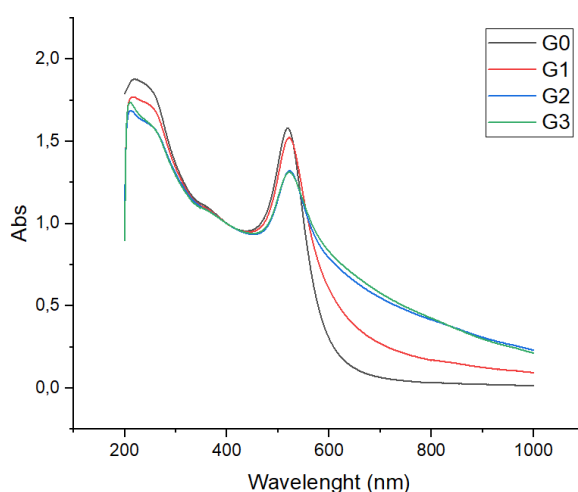


Figura 2.6: spettri UV-Vis dei campioni G (0-3).

Tabella 2: Campioni di particelle aggregate presi in considerazione in questa tesi.

Campione	AuNP (μL)	NaCl 10^{-1}M aggiunto (μL)	Rapporto di diluizione	Concentrazione di NaCl (M)	Abs normalizzata a 400 nm ($b=1$)
G0	1000	0	Non diluito	5,0 E-05	1,58
G1	400	100	4:1	0,020	1,52
G2	300	100	3:1	0,025	1,32
G3	200	100	2:1	0,033	1,31

In tabella 2: G0 è la soluzione di partenza di nanoparticelle sintetizzate; a questa è stata poi aggiunta una soluzione di NaCl 10^{-1}M , in modo da aumentare sempre di più la concentrazione del sale (da G1 a G3).

2 -PARTE SPERIMENTALE

In figura 2.7 sono riportati i risultati ottenuti dagli spettri elaborati con programma Fitspettri.

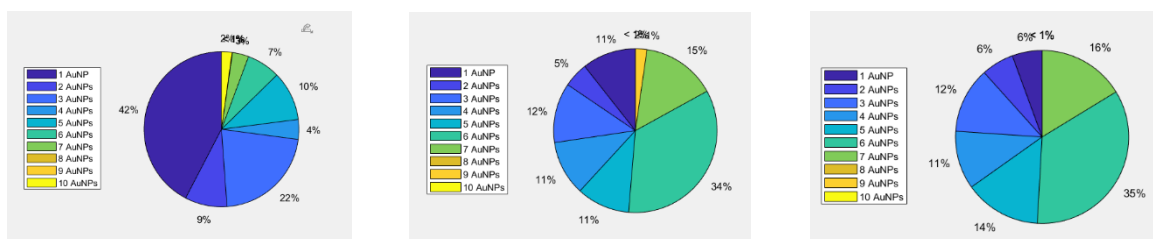


Figura 2.7: diagrammi a torta ottenuti con Fitspettri; questi mostrano rispettivamente, da sinistra verso destra, le soluzioni G (1-3).

In figura, si osserva come all'aumentare della concentrazione di sale, passando da G1 a G3, aumenti la percentuale di nanoparticelle aggregate (e la dimensione dei nanoclusters).

In conclusione, è stato possibile controllare l'aggregazione delle nanoparticelle colloidali mediante variazioni di concentrazioni di NaCl.

2.3 Funzionalizzazione di AuNP con PEG-SH

Per continuare ad indagare ulteriormente i fenomeni di aggregazione delle nanoparticelle si è scelto di funzionalizzarle con polietilenglicole tiolato PEG-SH ($MW= 5000 \text{ g mol}^{-1}$) che può influenzare l'aggregazione ottenuta con NaCl.

Le nanoparticelle sintetizzate e non aggregate (di cui nel paragrafo precedente) sono state prima funzionalizzate con una soluzione di PEG-SH ottenendo una concentrazione di PEG-SH di 10^{-6} M , sufficiente a funzionalizzare le nanoparticelle con circa un migliaio di molecole polimeriche, dato che le nanoparticelle hanno concentrazioni nanomolari. Dopo questa reazione la concentrazione di NaCl è stata aumentata, aggiungendo aliquote di soluzione NaCl 10^{-1} M . In Figura 2.8 sono riportati gli spettri delle soluzioni dei campioni riportati in Tabella 3.

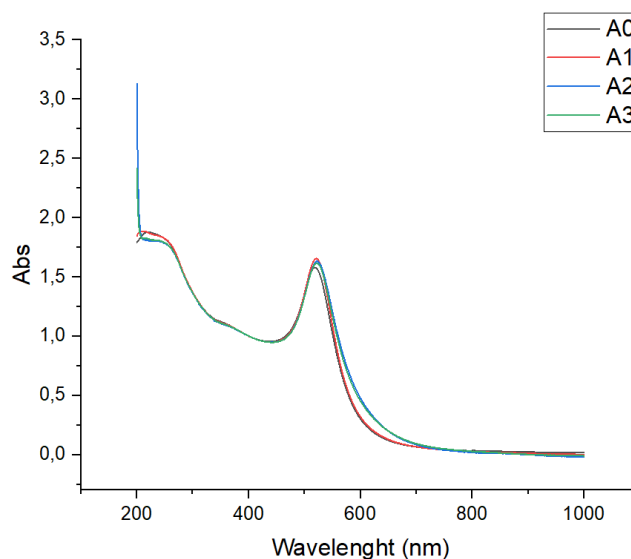


Figura 2.8: spettri UV-Vis dei campioni in tabella 3. A0 corrisponde alle particelle d'oro ablate senza nessuna aggiunta, andando da A1 ad A3 aumenta la concentrazione di sale ma non si osserva una significativa variazione del picco plasmonico.

Tabella 3: campioni preparati, prima sono stati funzionalizzati con polimero e dopo 15 minuti è stata aggiunta una soluzione di NaCl al campione.

Campione	AuNP 2,04 nM (μL)	PEG-SH 10^{-4} M (μL)	NaCl 10^{-1} M aggiunto (μL)	Concentrazione di NaCl (M)	Rapporto diluizione AuNP:NaCl
A0	1000	0	0	$5,0 \text{ E-}05$	Non diluito
A1	1000	10	0	$5,0 \text{ E-}05$	Non diluito
A2	1000	10	500	0,033	2:1
A3	1000	10	1000	0,05	1:1

In tabella 3 sono riportati i campioni preparati. In ordine, da A(0-3) aumenta la concentrazione di NaCl in soluzione. Negli spettri riportati in figura, si nota che le risonanze che caratterizzano l'aggregazione delle particelle a 600-700 nm ora sono assenti anche per le soluzioni con una grande quantità di NaCl. Questo dimostra che il polimero che ha funzionalizzato la superficie delle nanoparticelle permette di contrastare la loro aggregazione per la presenza di NaCl.

Il fit degli spettri con il programma Fitspettri permette di ottenere i seguenti grafici a torta (fig. 2.9), che non mostrano significative variazioni di percentuale di particelle aggregate.

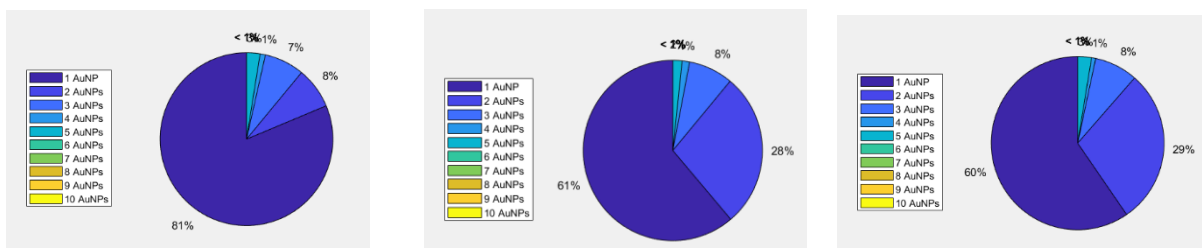


Figura 2.9: diagrammi a torta ottenuti con Fitspettri andando da sinistra verso destra si hanno rispettivamente i campioni A (1-3). Questi sono composti per almeno il 60% di nanoparticelle non aggregate.

Confrontando questi campioni (A 0-3) con la distribuzione delle nanostrutture nella soluzione di partenza (in fig. 2.7; campioni G 0-3) si nota come queste abbiano aggregato poco rispetto a quando invece non fossero state funzionalizzate con PEG-SH.

2.3.1 Funzionalizzazione di AuNP con PEG-SH e colorante

Le nanoparticelle sono state ulteriormente funzionalizzate con il colorante Texas Red (TR) (vedere par. 1.2.2) che è un SERS reporter, cioè consente di osservare segnali SERS in uno spettro Raman. Il TR è stato scelto perché presenta bande di assorbimento (fig. 2.10) centrate a circa 600 nm (nella stessa regione del plasmon degli aggregati) cioè in prossimità della lunghezza d'onda di eccitazione del laser utilizzato per l'eccitazione degli spettri Raman (633nm).

L'aggregazione delle AuNP comporta la formazione di *hot spots* (si veda cap. 1.3.1): queste regioni interparticellari permettono di osservare segnali Raman più intensi per il TR.

2 -PARTE SPERIMENTALE

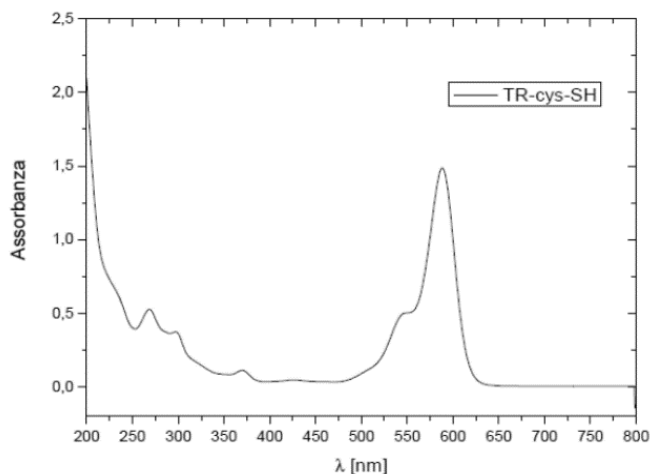


Figura 2.10: spettro UV-Visibile del colorante TR-cys-SH ($b=2\text{mm}$).

Di seguito viene quindi mostrato come la concentrazione di PEG-SH in sospensione influisca sull'aggregazione delle AuNP variando, di conseguenza, l'intensità del segnale SERS osservata per il colorante.

Sono state quindi preparate 4 soluzioni (B1-B4), per aggiunta di NaCl, TR, e PEG-SH alle nanoparticelle, facendo in modo che variasse solo la concentrazione di PEG-SH.

I campioni sono stati caratterizzati mediante spettroscopia UV-Vis-NIR (fig. 2.11); i dati dei campioni preparati sono riportati in tabella 4.

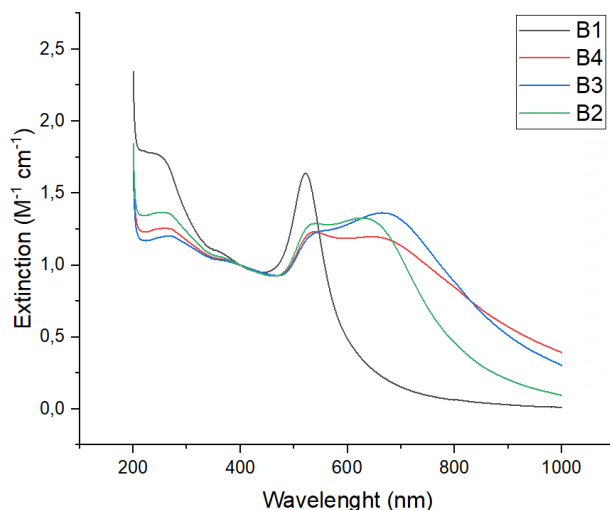


Figura 2.11: spettri UV-Vis-NIR dei campioni B (1-4).

In tabella sono riportati i diversi campioni analizzati, da B1 a B4 la concentrazione di PEG-SH utilizzato per la funzionalizzazione decresce: la soluzione di polimero (inizialmente di concentrazione pari 10^{-6}M) è stata man mano diluita prima di essere utilizzata per la preparazione del campione. Il campione è stato funzionalizzato anche con una soluzione di

colorante di 10^{-7} M, ed infine è stata aggiunta una soluzione di NaCl 10^{-1} M.

Tabella 4: tabella dei campioni preparati B (1-4). È stata fatta variare unicamente la concentrazione di PEG-SH: questa diminuisce passando da B1 a B4.

Campione	AuNP 2,04 nM (μ L)	Texas Red 10^{-7} M (μ L)	NaCl 10^{-1} M aggiunto (μ L)	PEG-SH 10^{-4} M (μ L)	Concentrazione di NaCl (M)	Concentrazione PEG- SH (M)
B1	750	7	250	10	0,025	1,0 E -06
B2	750	7	250	10	0,025	3,33 E -07
B3	750	7	250	10	0,025	2,0 E -07
B4	750	7	250	10	0,025	1,0 E-07

Negli spettri (Figura 2.11) si osserva che, nel caso del campione B1, la più alta concentrazione di PEG-SH non permette un'aggregazione efficace delle nanoparticelle; negli altri campioni preparati si realizza uno spostamento del picco plasmonico da 520 nm a valori leggermente superiori e la comparsa di un altro picco nell'intervallo dei 600-700nm: questo fenomeno è dovuto alla formazione di nuovi aggregati favorita dalla presenza del colorante. Il colorante infatti favorisce l'aggregazione delle AuNP. Quindi l'aggregazione maggiore si osserva per il campione B4, che mostra estinzione maggiore a lunghezze d'onda relative ad aggregati costituiti da più di 10 AuNP (intorno i 1000 nm).

In questo caso non è stato possibile fittare gli spettri con il programma FitSpettri in quanto questo non sarebbe in grado di fornire dati affidabili per aggregati di questa grandezza, molti costituiti da più di 10 nanoparticelle.

2.4 Spettri Raman ed effetto SERS

Mediante spettroscopia Raman è stato possibile trovare una correlazione tra la concentrazione di polimero in soluzione ed il segnale SERS. In effetti, come è stato precedentemente visto (par. 2.3.1), l'aggregazione delle nanoparticelle veniva man mano favorita al diminuire della concentrazione del polimero in soluzione e questo influenza certamente l'intensità dei segnali SERS.

Gli spettri Raman (Figura 2.12 e 2.13), mostrano che l'intensità delle caratteristiche bande del Texas Red, in particolare quelle a 1505 e 1649 cm^{-1} , aumenta diminuendo la concentrazione del polimero. In altre parole, l'aggregazione delle nanoparticelle permette di generare *hot spots*

(par. 1.2.1), dove l'intensità del campo elettromagnetico incidente viene amplificato, e un maggior numero di hot spots fa aumentare l'intensità delle bande SERS del colorante.

Quando le nanoparticelle sono poco aggregate, è difficile distinguere il segnale caratteristico del Texas Red dal rumore di fondo, come si vede in Figura 2.12 dove è riportato lo spettro Raman del campione B1 (si veda par. 2.3.1; Tabella 4), quello con minore aggregazione.

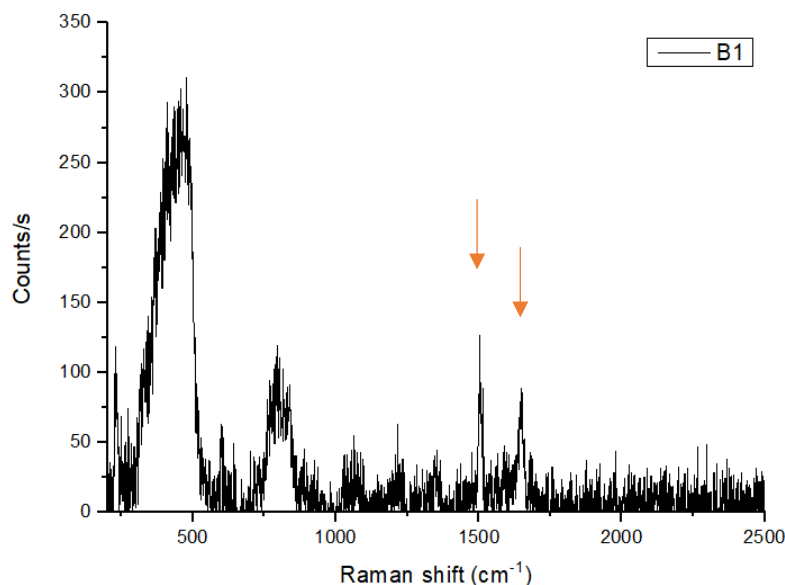


Figura 2.12: spettro Raman del campione B1 (par. 2.3.1).

Gli spettri Raman registrati per tutti i campioni B (1-4) sono riportati in Figura 2.13 e in tabella 5 sono riportati i dati significativi degli spettri.

Gli spettri sono stati registrati usando la radiazione a 633 nm di un laser a He-Ne, un obiettivo 10x e una potenza del laser al 50% di quella massima in uscita dal laser, che è di 12 mW. I valori di ϵ (valore di estinzione) sono stati ottenuti dagli spettri UV-Vis-NIR dei campioni mentre i conteggi SERS sono relativi agli spettri Raman raccolti.

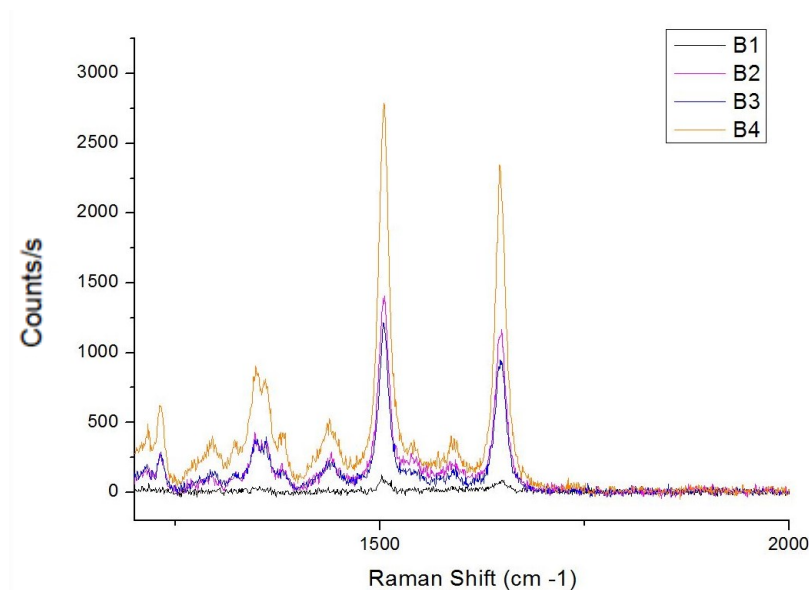


Figura 2.13: spettri Raman dei campioni B(1-4).

Tabella 5: dati relativi agli spettri Raman e UV-Vis dei campioni B (1-5).

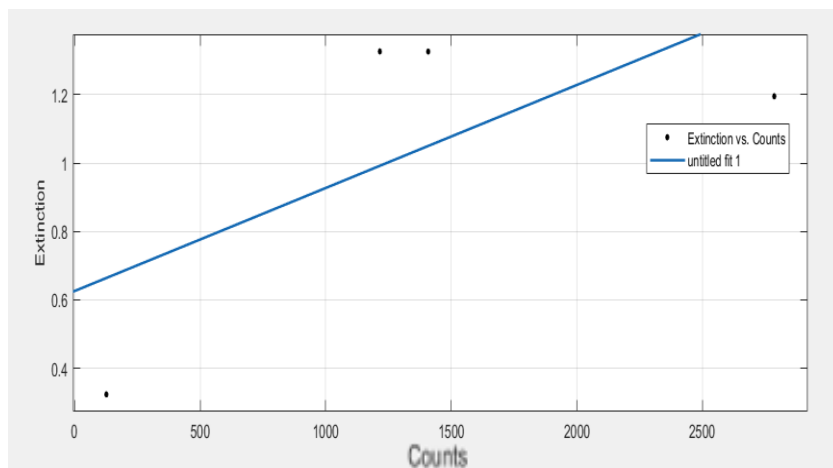
Campione	Concentrazione PEG-SH (M)	Conteggi a 1500 cm^{-1} (counts/s)	ϵ , 633 nm, $b=2\text{mm}$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	ϵ , 1000 nm, $b=2\text{mm}$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
B1	1,0 E -06	126, 50	0,324	0.0119
B2	3,33 E -07	1407,84	1,326	0.0959
B3	2,0 E -07	1215,3	1,326	0.3038
B4	1,0 E -07	2785,48	1,195	0.3936

Negli spettri Raman riportati in figura, si può notare come all'aumentare dell'aggregazione, e quindi diminuendo la concentrazione di PEG-SH, il segnale del SERS reporter risulti più intenso. In particolare, per il campione B4 si osserva un incremento del segnale Raman, rispetto al campione B1 di un fattore di circa 10^3 .

Ponendo in grafico i coefficienti di estinzione dei campioni a 633 nm con i conteggi riportati per il Raman, ci si aspetta un andamento crescente (Figura 2.14). Un andamento lineare potrebbe essere atteso considerando che i segnali SERS siano proporzionali al numero di hot spots, ma un fit lineare dei dati mostra comunque un risultato molto povero, come si può vedere dai dati riportati a fianco di Figura 2.14.

2 -PARTE SPERIMENTALE

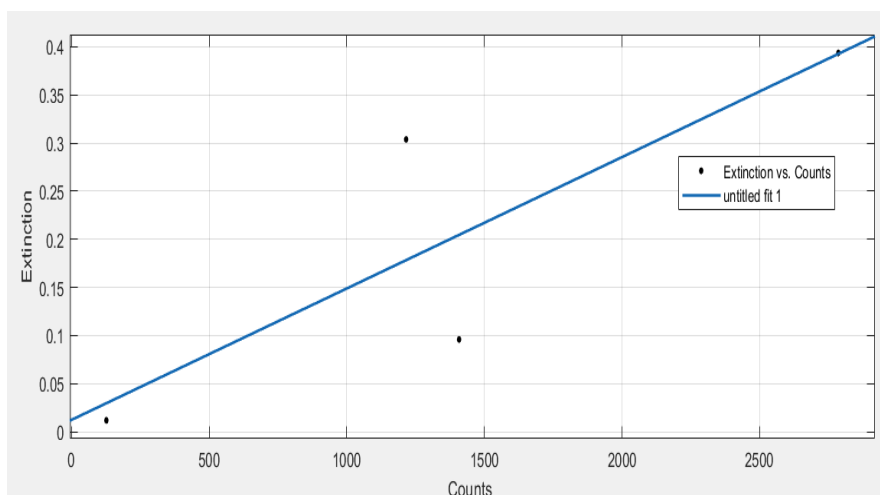
Lo spettro di estinzione cambia forma in funzione dell'aggregazione delle particelle ed è quindi difficile che vi sia una proporzionalità ad una lunghezza d'onda precisa. Poiché lo spettro di estinzione tende a zero per grandi lunghezze d'onda, ma questo accade in funzione del numero di aggregati presenti nel campione, è stata esplorata la possibilità che un andamento più lineare potesse essere ottenuto usando l'estinzione alla maggiore lunghezza d'onda in cui lo spettro era stato registrato e cioè a 1000 cm^{-1} .



Goodness of fit:
SSE: 0.3763
R-square: 0.4628
Adjusted R-square: 0.1942
RMSE: 0.4338

Figura 2.14: in ordinata i conteggi ricavati dagli spettri Raman; in ascissa i coefficienti di estinzione calcolati a 633 nm .

Il grafico è riportato in Figura 2.15. In questo caso un andamento lineare risulta essere migliore che nel caso precedente anche se ancora non del tutto soddisfacente.



Goodness of fit:
SSE: 0.02787
R-square: 0.705
Adjusted R-square: 0.5575
RMSE: 0.1181

Figura 2.15: in ascissa i conteggi ricavati dagli spettri Raman; in ordinata i coefficienti di estinzione calcolati a 1000 nm .

Un'analisi più approfondita potrebbe essere ottenuta con il fitting degli spettri UV-vis-NIR che consentirebbe di ottenere il numero di aggregati presenti in ogni campione. Questo però

necessita del calcolo degli spettri di aggregati di maggiori dimensioni che per adesso non è ancora disponibile.

3. CONCLUSIONI

Lo scopo della tesi era quello di ottenere spettri Raman amplificati dalla presenza di aggregati di particelle plasmoniche, cioè spettri SERS (surface enhanced Raman scattering) e di correlarli con ciò che viene osservato negli spettri di estinzione UV-vis-NIR. Sono state usate nanoparticelle plasmoniche di oro ottenute per ablazione laser, che non necessitano di essere stabilizzate, consentendo una più facile funzionalizzazione con un SERS reporter.

Nella prima parte dello studio si è capito come favorire, usando concentrazioni variabili di NaCl in soluzione, l'aggregazione delle nanoparticelle. Successivamente queste sono state funzionalizzate con PEG-SH e con il SERS reporter (Texas Red) per controllare l'aggregazione, e quindi gli hot spots, e ottenere spettri SERS.

La correlazione tra l'intensità degli spettri SERS e l'estinzione degli spettri UV-vis-NIR ha mostrato che, pur essendoci un incremento dell'intensità dei segnali SERS con l'aumento dell'aggregazione, un andamento regolare non sembra essere presente.

Il fitting degli spettri per ottenere indicazione delle aggregazioni presenti nel campione potrà fornire indicazioni più precise sulla presenza degli hot spots che sono alla base dell'intensità dei segnali SERS.

RIFERIMENTI

- [1] La coppa di Licurgo, collezione del British Museum (2022, Ottobre 15). <https://www.britishmuseum.org/collection/search?keyword=lycurgus&keyword=cup>
- [2] Reddy, V. R., *Gold nanoparticles: synthesis and applications.*, Synlett, **2006**(11), 1791-1792.
- [3] Turkevitch, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11, 55.
- [4] Frens G., *Nature: Phys. Sci.* **1973**, 241, 20.
- [5] Busbee, B. D.; Obare S. O.; Murphy, C. J. *Adv.Mater.* **2003**, 15, 414.
- [6] Meltzer, S.; Resch, R.; Koel, B. E.; Thompson, M. E.; Madhukar, A.; Requicha, A. A. G.; Will, P., *Langmuir* **2001**, 17, 1713.
- [7] Wilcoxon, J. P.; Provencio, P.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 6402.
- [8] Kreibig, U.; Vollmer, M. *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer, Berlin 1994.
- [9] Bohren, C. F.; Huffman, D. R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles, 2nd ed.*; Wiley-Interscience: New York, 1998.
- [10] Anderson, L. J. E.; Mayer, K. M.; Fraleigh, R. D.; Yang, Y.; Lee, S.; Hafner, J. H. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 11127.
- [11] Efrima, S.; Metiu, H. *J. Chem. Phys.* **1979**, 70, 1602.
- [12] Aravind, P. K.; Metiu, H. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 74, 301.
- [13] Gersten, J. I.; Nitzan, A. *J. Chem. Phys.* **1980**, 73, 3023.
- [14] Wang, D.-S.; Chew, H.; Kerker, M. *Appl. Opt.* **1980**, 19, 2256.
- [15] Rampi, M. A.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M. *Appl. Phys. Lett.* **1998**, 72, 1781.
- [16] Greenwood N.N.; Earnshaw, A., *Chemistry of the elements*, Elsevier science, Oxford, 2007.
- [17] C. V. Raman, K. S. Krishnan, *Nature* 121, 501 (1928).
- [18] D. L. Jeanmaire, R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.* 84, 1 (1977).
- [19] M. G. Albrecht, J. A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.* 99, 5215 (1977).
- [20] Litti, L.; Meneghetti, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2019**, 21, 15515-15522.