



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Espectroscopía Raman
sensibilizada en superficie
(SERS) para la investigación
de colorantes orgánicos
naturales utilizados en
objetos del patrimonio
cultural**

Alumno: Ignacio Olea Albar

Septiembre, 2014

Índice

1- Objetivos

2 - Introducción

3 - Materiales y métodos

3.1- Instrumentación

3.2 - Reactivos

3.3 - Procedimiento experimental

3.4 - Muestras

4 - Resultados y discusión

4.1 - Estudios preliminares: espectroscopia Raman convencional

4.2 - Espectroscopía Raman sensibilizada en superficie

4.2.1 - Coloide Lee-Meisel

4.2.1.1 - Medida de colorantes

4.2.1.2 - Estimación de la concentración mínima detectable

4.2.1.3 - Efecto del pH

4.2.1.4 - Estabilidad del coloide Lee-Meisel

4.2.2 - Síntesis “in situ” de nanopartículas de plata

4.3 - Comparación de métodos

5 - Conclusiones

6 - Bibliografía

Resumen

En la última década la espectroscopia Raman se ha convertido en una de las técnicas imprescindibles en el campo de análisis de muestras de valor cultural gracias a su utilidad para la identificación molecular y a que es una técnica no destructiva obteniendo buenos resultados a la hora del análisis de pigmentos inorgánicos. Sin embargo con los colorantes orgánicos no es posible su uso debido a la alta fluorescencia que presentan al ser iluminados por un láser visible y su baja concentración debido a su poder de tinción. Por ello se está desarrollando una variante denominada Espectroscopia Raman sensibilizada en superficie (SERS) para solucionar este problema. En esta técnica las moléculas orgánicas utilizadas como colorantes se adsorben sobre una superficie metálica produciendo un fenómeno de sensibilización del efecto Raman.

Abstract

Last decade Raman spectroscopy has become one of most important techniques on the field of art works analysis through it's usefulness for molecular identification and the fact that is a non-destructive technique obtaining good results in inorganic pigment analysis. However, with organic colorant is not possible due to high fluorescence they present when they are illuminated by a visible laser, and their low concentration due to their staining power. Hence, it's being developed a variant called Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) to solve the problem. Organic molecules used as colorants are adsorbed on a metallic surface producing a Raman effect sensibilization.

1- Objetivos.

El objetivo de este trabajo fin de grado es caracterizar una serie de colorantes orgánicos a través de la espectroscopia Raman sensibilizada en superficies (SERS) así como estudiar la influencia de las condiciones experimentales a los resultados obtenidos (pH, concentración de colorante, sustrato metálico utilizado) para así aportar información a la hora de planificar los tratamientos previos de la muestra.

Además se estudiará la sensibilidad del método para demostrar si es apto para nuestro estudio debido a la escasa cantidad de muestra disponible.

Por último se compararán los resultados obtenidos con distintos tipos de sustratos metálicos en SERS y a su vez con los obtenidos en otras metodologías también manejadas en este tipo de estudios.

2. Introducción

El empleo de los colores es primordial en el arte, la pieza básica en toda composición artística desde los inicios del ser humano en cuevas con las pinturas rupestres. A través del color los artistas manifiestan sensaciones y emociones a la audiencia, pudiéndose obtener información de la obra estudiando la distribución y la composición de los colores en sus obras.

La diferente gama de colores se obtiene mediante la utilización de compuestos químicos, ya sean extraídos de fuentes naturales tales como minerales, plantas e insectos, u obtenidos mediante síntesis.

Generalmente en el mundo del arte se distinguen se hace una distinción entre pigmentos y colorantes basándose en su obtención y forma de uso. Los colorantes son sustancias que al aplicarlas sobre una superficie le otorga color permanente debido a una afinidad con el sustrato. El colorante se absorbe sobre el sustrato y este permanece en el mismo cuando el disolvente es evaporado. Los pigmentos, por el contrario, se aplican como suspensiones (sólidos en forma de finas partículas) de modo que al aplicarlo queda en forma de una fina película sobre el soporte utilizado. Otra diferencia es que un

colorante es soluble en el medio en el que se disuelve cuando un pigmento es insoluble en su vehículo denominado aglutinante. [Edward et al,2005].

A menudo desde el punto de vista químico se suelen denominar como colorante a aquellos compuestos de naturaleza orgánica y pigmento a aquellos de naturaleza inorgánica. Esta será la nomenclatura seguida en este trabajo a partir de este punto.

Un compuesto da color debido a que absorbe radiación comprendida en la región del visible (400-700 nm). Dependiendo de a que longitud de onda tenga un colorante su máximo de absorción dará un determinado color u otro.

Tabla 1. Relación color-longitud de onda absorbida

Color absorbido	Rojo	Anaranjado	Amarillo	Amarillo-Verdoso	Verde	Verde-Azulado	Azul	Violeta
$\lambda_{\max}$ (nm)	675	600	585	570	540	490	460	410
Color observado	Azul-verdoso	Azul	Violeta	Rojo-violaceo	Anaranjado	Amarillo	Amarillo-verdoso	Verde

Para que un compuesto pueda ser usado para dar color ha de cumplir una serie de requisitos tales como:

- Estabilidad térmica: el tono del color y sus propiedades no deben verse afectadas por la temperatura.
- Baja toxicidad: la cantidad de metales pesados puede ser perjudicial
- Resistencia ambiental: no deben degradarse cuando se ven sometidos a condiciones ambientales.
- Estabilidad química: el colorante no debe reaccionar con el medio donde se aplica o con los colorantes de alrededor.
- Dispersión: homogeneidad a la hora de aplicarlo sobre un medio. Está relacionado con el tamaño de partícula.

Se pueden clasificar en dos grandes grupos: orgánicos (naturales o sintéticos) e inorgánicos (de origen mineral mayoritariamente). Los primeros de los que se tiene constancia son compuestos minerales como los óxidos de hierro, cuya gama de colores se encuentra en muchas obras que datan del paleolítico.

Los pigmentos inorgánicos suelen ser óxidos de algún metal, aunque también puede darse el caso que aparezcan en forma de sulfuros, como el bermellón (sulfuro de mercurio), halogenuros como el rojo escarlata (yoduro de mercurio) o formando complejos de coordinación como el rojo Van Dyck (hexaferrocianuro de Cobre II).

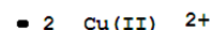
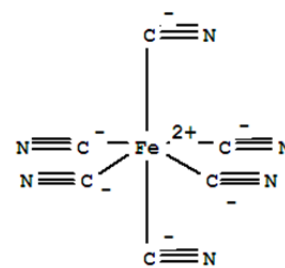


Ilustración 1. Rojo Van Dick

Algunos ejemplos de pigmentos inorgánicos son:

Tabla 2. Ejemplos de pigmentos inorgánicos

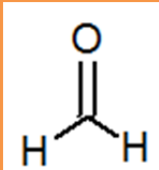
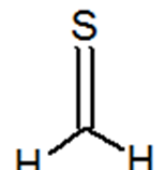
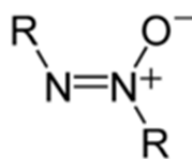
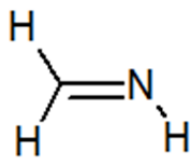
Colorante	Fórmula química
Amarillo de cromo	PbCrO_4
Amarillo de Nápoles	$\text{NiO} \cdot \text{Sb}_2\text{O}_3 \cdot 20\text{TiO}_2$
Azul de Prusia	$\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$
Azul egipcio	$\text{CaO} \cdot \text{CuO} \cdot 4\text{SiO}_2$
Bermellón	HgS
Blanco de molibdeno	PbMoO_4
Blanco de plomo	$2 \text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$
Blanco de Zinc	ZnO
Creta	CaCO_3
Malaquita	$\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$
Minio	Pb_3O_4
Negro marfil	$\text{C} + \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CaCO}_3$
Ocre rojo	Fe_2O_3
Oro musivo	SnS_2
Rojo púrpura	Ag_2CrO_4
Verde rinnman	$\text{CoO} \cdot \text{ZnO}$
Violeta de cobalto	$\text{Co}_3(\text{AsO}_4)_2$
Violeta de manganeso	$(\text{NH}_4)_2\text{Mn}_2(\text{P}_2\text{O}_7)_2$
Yeso	$\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Uno de los primeros sintéticos fue el blanco de plomo mezclando plomo con ácido acético (añadiendo vinagre) en presencia de dióxido de carbono. La revolución industrial amplió la gama de colorantes sintéticos sustituyendo a los colorantes naturales que debido a su escasez tenían un coste elevado. El número de pigmentos disponibles para los artistas ha ido aumentando considerablemente a la vez que lo han hecho los métodos desarrollados para su análisis [Edward et al,2005].

Por otro lado los colorantes orgánicos pueden clasificarse en un conjunto de familias tales como antraquinónicos, flavonoides, tiazinas, oxazinas, fenazinas, trifenilmetanos y xantenos.

Para que un compuesto orgánico posea la propiedad de dar color tiene que tener en su estructura uno o más grupos funcionales denominados cromóforos (portadores de color) que se encuentran unidos al grupo bencílico. Los principales grupos cromóforos son:

Tabla 3. Principales grupos cromóforos.

	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$	$\text{HN}=\text{NH}$	$\text{O}=\text{N}^+=\text{O}$
Carbonilo	Etileno	Azo	Nitro
	$\text{HN}=\text{O}$		
Tiocarbonilo	Nitroso	Azoxy	Azometil

Un auxócromo es un grupo funcional que por sí solo no da color a una molécula pero conjugado con un grupo cromóforo aumenta la intensidad del color. Los principales grupos auxócromos son el grupo fenólico (-OH), sulfónico (-SO₂), amino (-NH₂) o carboxilo (-CO-OH) [Leona et al, 2011].

Una de las principales técnicas de identificación molecular en el campo del patrimonio cultural es la espectroscopía Raman ya que necesita muy poca

cantidad de muestra y es una técnica no destructiva. El uso de la espectroscopia Raman para el análisis no destructivo de pigmentos o de obras de arte ha sido uno de los mayores éxitos en la aplicación de este método.

Otra ventaja importante es que la preparación de la muestra es mínima, si acaso limpiar la superficie con algodón o algún material similar para eliminar polvo o escombros [Leona et al,2011] .

La materia al ser irradiada con un haz de luz monocromático de frecuencia ν_0 absorbe la mayoría de la radiación, pero una pequeña parte se dispersa en todas direcciones. La mayor parte de esta luz dispersada tiene la misma frecuencia que la radiación incidente (dispersión Rayleigh o elástica) que no aporta información alguna sobre la composición de la muestra. Una parte de la misma sufre dispersión inelástica que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente. Estas dispersiones inelásticas se dan con una frecuencia que es característica de cada molécula, por lo que aporta información necesaria acerca de la composición. Si el fotón dispersado es de menor energía que el incidente se produce una dispersión Stokes y si es de mayor energía tiene lugar una dispersión anti-Stokes [Vandenabeele,2013].

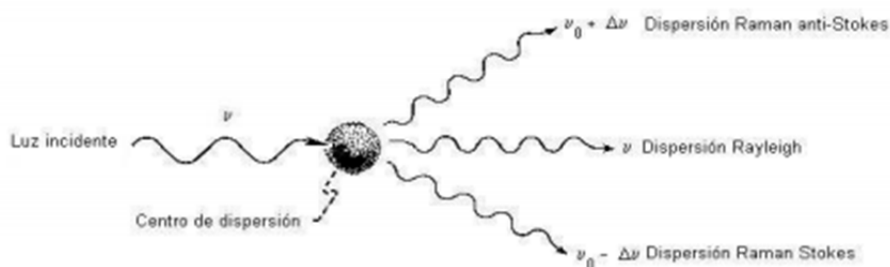


Ilustración 2. Tipos de dispersión [Smith & Dent,2006]

Con la ayuda de un diagrama energético podemos explicar más fácilmente este fenómeno.

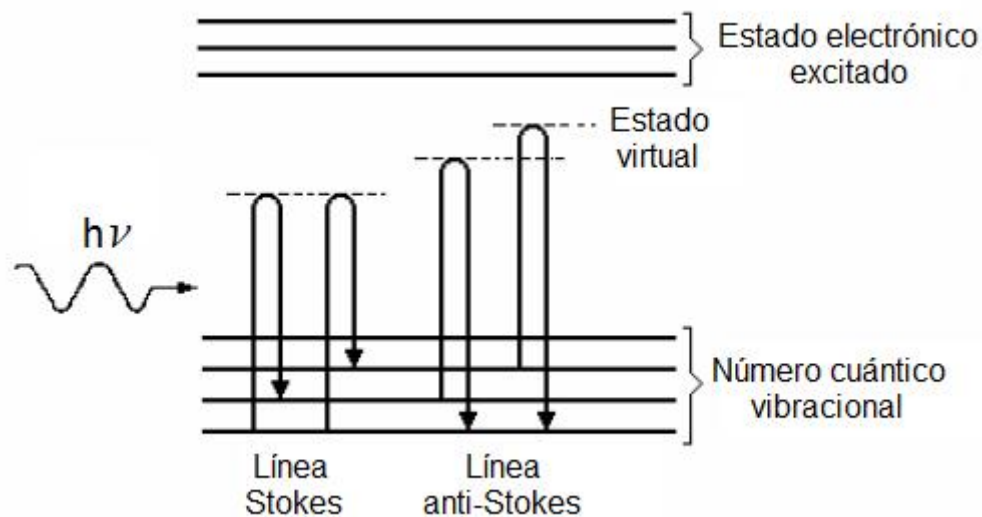


Ilustración 3. Diagrama energético y transiciones electrónicas. [Smith & Dent, 2006]

Cuando un haz de fotones incidente con una energía mucho mayor a la diferencia de energía entre dos estados vibracionales de la molécula choca con ella, la mayor parte atraviesan pero una pequeña parte es dispersada. El fotón incidente lleva a la molécula a un estado de energía vibracional superior no permitido, el cual abandona rápidamente emitiendo otro fotón con una frecuencia que dependerá del salto de energía vibracional que se produzca.

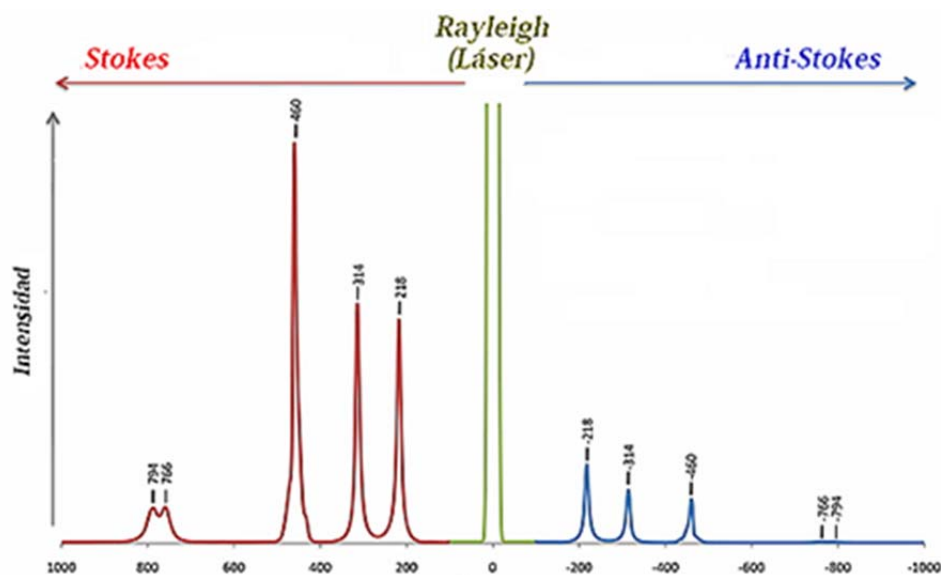


Ilustración 4. Ejemplo de espectro Raman. [Smith & Dent, 2006]

En el caso de la dispersión Rayleigh la molécula vuelve al mismo estado vibracional en el que permanecía antes del choque de modo que ni el fotón ni la molécula sufren variación de energía alguna.

En el caso de la dispersión Raman el estado vibracional antes y después del choque no es el mismo, dándose una transferencia de carga entre el fotón y la molécula. En la dispersión Stokes la molécula regresa a un estado de energía superior permitido al que tenía inicialmente y en la dispersión Anti-Stokes regresa a uno inferior.

El espectro Raman está formado por una banda Rayleigh colocada en el centro del espectro (siendo notablemente la más intensa) y unos conjuntos de bandas Stokes y Anti-Stokes que se sitúan de forma simétrica alrededor de la anterior. Teniendo en cuenta que el desplazamiento Raman no depende de la frecuencia incidente y que el espectro Raman es simétrico (aunque la dispersión Stokes es más intensa que la dispersión Anti-Stokes) se suele tomar como inicio del eje de abscisas el centro de la banda Rayleigh.

Como la dispersión Stokes es más intensa que la Anti-Stokes se trabaja en la parte del eje de abscisas donde aparece la primera [Smith & Dent ,2006].

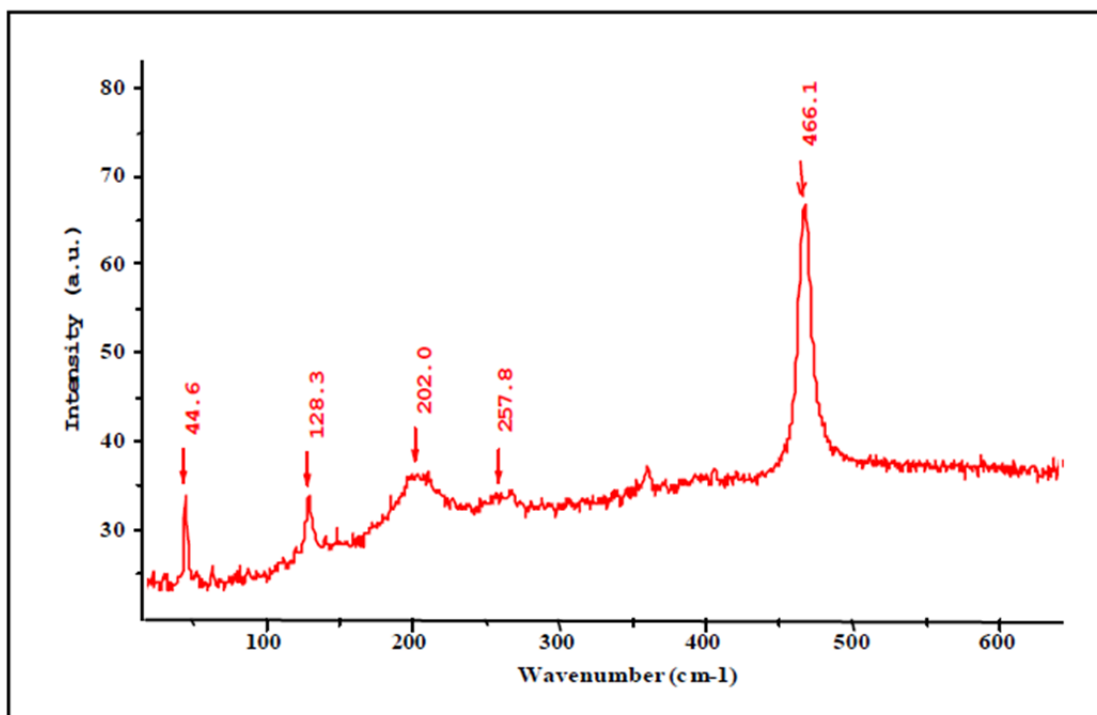


Ilustración 5. Representación usual de un espectro Raman. [Smith & Dent,2006]

En la aplicación de la espectroscopía Raman para la caracterización de colorantes orgánicos encontramos dos grandes problemáticas: 1) los colorantes naturales son moléculas orgánicas que muestran una gran cantidad de radiación fluorescente cuando son irradiadas por los láseres visibles

utilizados en esta técnica (llegando a ser más intensa que la dispersión Raman escondiendo totalmente el espectro Raman obtenido) y 2) estos pigmentos y colorantes se encuentran en muy baja concentración debido a que son diluidos por su gran poder de tinción (la baja sensibilidad del Raman no permite en muchos casos la detección) [Osticioli et al, 2006].

Debido a estos inconvenientes se está desarrollando actualmente una nueva técnica Raman denominada Espectroscopía SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering*) o Espectroscopía Raman sensibilizada en superficies. En esta técnica se adsorbe el colorante sobre una superficie metálica (a través de la adición de nanopartículas metálicas) para después ser irradiada con el láser visible. Las ventajas de esta técnica es que la intensidad de los espectros aumenta en 6 órdenes de magnitud respecto a la técnica Raman convencional y la fluorescencia que emiten estas moléculas orgánicas se ve considerablemente reducida por lo que sus interferencias son mucho menores.

El mecanismo del efecto SERS es todavía un tema de investigación, aunque actualmente hay dos teorías principales. Una teoría electromagnética que postula la excitación de los plasmones superficiales sobre los que se apoyan las nanopartículas y una teoría química que propone la formación de complejos de transferencia de carga entre el metal y el sustrato [Schlücker et al, 2011].

Los resultados obtenidos con la espectroscopía SERS dependen de muchas condiciones tales como longitud de onda del láser de excitación, tipo de sustrato metálico SERS utilizados así como su forma de preparación, pH de las disoluciones de la molécula en estudio, etc.

Los estudios realizados al respecto se realizaron añadiendo a una disolución que contiene el colorante un coloide metálico de plata u oro o fijando este colorante sobre la superficie de sustancias como rodamina, cristal violeta o colorante cyan. A través de esta técnica han sido caracterizadas multitud de compuestos tales como proteínas [Garrido et al, 2010], pesticidas [Zhang et al, 2014] e incluso principios activos utilizados en medicina [Sallum et al, 2014].

En el análisis de muestras de valor cultural se han desarrollado numerosos trabajos resaltando los realizados por Marco Leona y Concepción Domingo en

los cuales se han utilizado diversos coloides como sustratos metálicos. Se describe además procesos de extracción y tratamientos previos de muestras en diferentes soportes artísticos.

La síntesis de coloides metálicos en disolución se realizan mediante el empleo de los siguientes sustancias: a) un precursor metálico (en el que se encuentra el metal a utilizar) b) un agente reductor y c) un agente estabilizante (para evitar la agregación de las nanopartículas una vez formadas) cuando sea necesario.

Los métodos de síntesis de nanopartículas de plata más utilizados son el método de Lee-Meisel [*Lee & Meisel, 1982*] (empleando nitrato de plata como precursor metálico y citrato de sodio como agente reductor) y el método Creighton [*Creighton et al, 1979*] (utilizando el mismo agente precursor pero en este método es reducido con borohidruro de sodio). También se han utilizado otra serie de agentes reductores como ácido ascórbico, polioles o monosacáridos. El uso de un agente reductor u otro influye en el tamaño de las nanopartículas.

Asimismo es posible obtener nanopartículas de plata mediante el método de Tollens. En la siguiente tabla se muestran algunos métodos de síntesis de nanopartículas de plata en disolución [*Monge et al, 2009*].

Tabla 4. Métodos de síntesis de nanopartículas de plata. [*Monge, 2009*]

Precursor	Reductor	Estabilizante
AgNO_3	Citrato	
AgNO_3	Borohidruro sódico	
AgNO_3	Ácido ascórbico	
AgNO_3	Polioles	PVP
AgNO_3	β -D-glucosa	Almidón
$[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$	Azúcares	
AgNO_3	DMF	APS
AgNO_3	DMF	PVP
$\text{Ag}(\text{COOR})$	Termólisis	
$\text{Ag}(\text{COOCH}_3)$	Acetaldehido	HDA

Ag(COOCH₃)	OLA	OLA
AgNO₃	Ácido ascórbico	CTAB
AgNO₃	Hidrazina	AOT
AgNO₃	Radiación UV	PVP
AgNO₃	Radiación UV	HDA

APS = aminopropiltietoxisilano, PVP = polivinilpirrolidona, HDA =hexadecilamina, OLA = oleilamina, CTAB = Bromuro de cetiltrimetil amonio, AOT = bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio, PEG = polietilenglicol.

En este trabajo se utilizará dos tipos de coloides metálicos: Coloide de Lee-Meisel y la síntesis “in situ” de nanopartículas de plata. Esta síntesis “in situ” se realiza con nitrato de plata y citrato de sodio (mismos reactivos que para el coloide de Lee-Meisel) pero las nanopartículas se forman con el calor que desprende el láser al irradiar la muestra. Las ventajas de utilizar este coloide con respecto al de Lee-Meisel es evitar todo el proceso de síntesis y eliminar posibles problemas de estabilidad del coloide.

Las técnicas cromatográficas, fundamentalmente HPLC acopladas a diferentes sistemas de detección también juegan un papel importante en este tipo de análisis aunque tienen dos grandes inconvenientes: son destructivas (algo no deseable debido al valor cultural de las muestras) y requieren de una cantidad de analito relativamente grande (que no disponemos en este tipo de muestras).

Otras técnicas de análisis pueden ser utilizadas:

- Difracción de rayos X: solo es posible determinar la composición a nivel atómico y en sustancias con una estructura cristalina.
- Espectroscopía de fotoelectrones: permite la identificación únicamente de sustancias sólidas y se necesita un alto vacío.
- Espectroscopia de infrarrojo: se necesita hacer una lámina muy delgada con la muestra para que sean transparentes al infrarrojo.

Además las técnicas antes mencionadas necesitan un equipo de valor similar o superior al de un equipo Raman [Stuart et al,2008].

Por otro lado realizaremos una medida de los tres colorantes orgánicos estudiados con FT-Raman (Espectroscopía Raman por transformada de

Fourier). Estos instrumentos utilizan un laser a una mayor longitud de onda (1064 nm) para tratar de evitar el problema de la fluorescencia. En FT-Raman no es posible la utilización de detectores CCD ya que estos tienen poca sensibilidad por encima de 900 nm, además que la intensidad Raman es menor cuando se excita en el visible. Por ello se utiliza un interferómetro como analizador y un detector de germanio enfriado con nitrógeno líquido. Una precaución a la hora de utilizar este sistema es la calcinación de la muestra, ya que el láser al ser más energético puede destruirse por calentamiento. Teniendo en cuenta el valor cultural de nuestras muestras hay que tener principal cuidado. Para evitar esto se realizan medidas con potencia de láser menores y con un mayor número de acumulaciones.

Un inconveniente de esta técnica es su poca sensibilidad, por ello no se utiliza de forma rutinaria para este tipo de muestras. *[C.Domingo,2011]*.

El análisis de los colorantes existentes en una obra favorece un mejor entendimiento de la misma para historiadores, restauradores y críticos del arte. Una posible aplicación de este trabajo es la datación. Todo pigmento tiene un periodo de utilización en el cual los autores lo utilizaban para realizar sus obras. Conociendo que pigmentos fueron utilizados en una determinada obra podemos ser capaces de estimar la época en la que se realizó y a la vez realizar un estudio acerca de las técnicas pictóricas utilizadas. En el marco de la conservación y la restauración la determinación de colorantes nos da una vía para realizar una rehabilitación y conservación con una base científica dándonos una idea acerca de la estabilidad del pigmento y posibles degradaciones de los mismos determinando cambios físicos y/o químicos que favorecen el deterioro de la obra a través de la identificación de los productos de degradación.

Otro campo de aplicación de análisis de colorantes es el de la autenticación en el arte. Conociendo la composición de una determinada obra de arte podemos estudiar si dicha obra es autentica o no. Por ejemplo, si descubrimos un pigmento cuyo descubrimiento o síntesis haya sido reciente en una obra antigua es lógico pensar que la obra es fraudulenta. Otro ejemplo sería descubrir un pigmento en una obra de arte de un determinado pintor sabiendo

que dicho pintor nunca utilizó el colorante estudiado (los pigmentos no son coherentes con la firma) [Edward et al,2005].

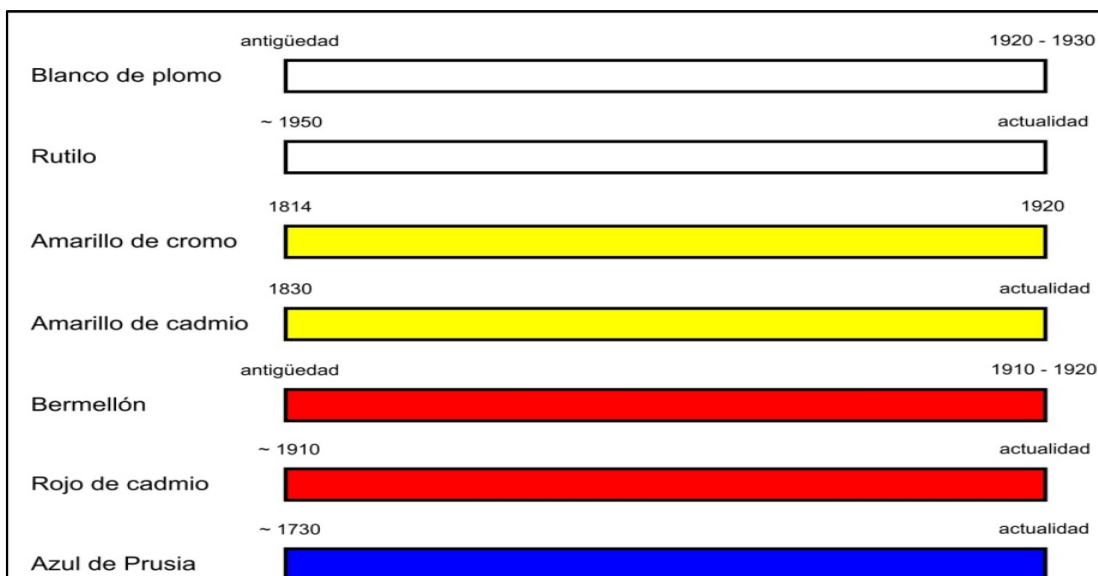


Ilustración 6. Periodo de utilización de diversos pigmentos.

3. Materiales y métodos.

3.1- Instrumentación.

En este trabajo se utiliza un espectrómetro Raman para realizar medidas sobre los pigmentos y colorantes estudiados.

Un espectrómetro Raman dispersivo convencional está compuesto por los siguientes componentes fundamentales:

- Láser: es el encargado de la excitación de la muestra. Está compuesto por un haz de luz monocromático (en nuestro caso es roja). Puede ser un láser continuo o pulsado (FT-Raman). Convencionalmente se utilizan láseres continuos con longitud de onda variable (desde infrarrojo a ultravioleta)
- Detector CCD (*charge-coupled device*): se encarga de acumular la señal de las distintas longitudes de onda para enviarla al sistema informático.
- Equipo informático: compuesto por un ordenador y un software que transforma los datos provenientes del CCD en espectros.

- Fibra óptica: dispositivo en el cuál la luz monocromática viaja a la muestra y de la muestra al monocromador.
- Monocromador: separa la luz proveniente del cabezal óptico en sus distintas longitudes de onda. Normalmente se utiliza una red de difracción como monocromador.
- Cabezal óptico: compuesto por una serie de lentes y filtros que se encargan de enfocar la luz sobre la muestra y recoger la dispersión Raman que esta devuelve.

Con el láser se irradia sobre la muestra parte de la radiación es dispersada hacia una red de difracción que separa físicamente la luz en sus diferentes longitudes de onda que son dirigidas hacia los canales del detector (un canal para cada longitud).

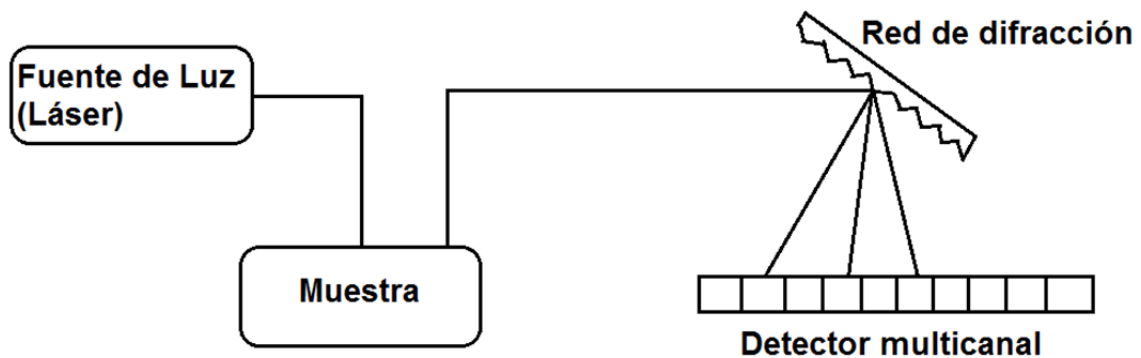


Ilustración 7. Partes de un espectrómetro Raman.

A través de un espectrómetro Raman irradianos un haz de luz (láser) sobre la muestra a estudiar para recoger la luz dispersada que se produce. En este trabajo se utilizara un espectrómetro Raman portátil (marca BWTEK) como el que se muestra en la siguiente imagen:

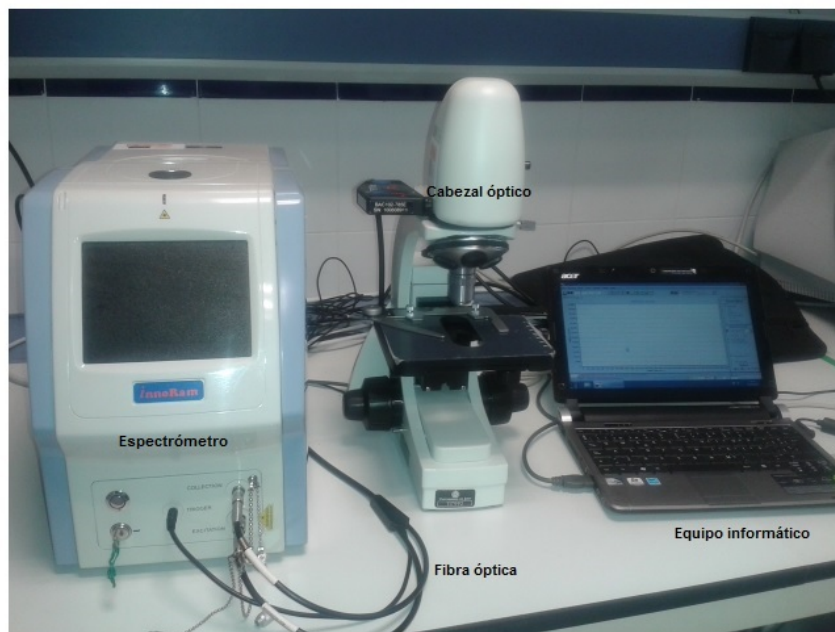


Ilustración 8. Fotografía del equipo utilizado.

Además el equipo Raman utilizado en este trabajo tiene un videomicroscopio acoplado al cabezal óptico con posibilidad de un aumento 20x para la visualización de las muestras. Se trabaja con un láser de 785 nm cuya potencia de salida es de 300 mW

Para realizar las medidas se manejan tres variables instrumentales:

- Tiempo de exposición: indica el tiempo en el que la muestra es irradiada por el láser. Se utilizarán tiempos de exposición cortos (10-15 segundos). A mayor tiempo de exposición mayor intensidad de las bandas obtenidas.
- Intensidad de láser: podemos ajustar la intensidad del láser. En este trabajo usaremos una potencia baja (menor del 30%).
- Número de acumulaciones: indica el número de medidas que realiza el espectrómetro. Lo habitual en este trabajo será realizar pocas acumulaciones (en torno a 10). A mayor número de acumulaciones menor ruido en el espectro Raman obtenido.

Para medir la estabilidad del coloide Lee-Meisel sintetizado se utilizó un espectrofotómetro ultravioleta. Marca Cary 50 Varian.

Además se realizó una serie de medidas complementarias con un espectrómetro Raman con transformada de Fourier (marca Bruker).

3.2 - Reactivos.

En este trabajo fueron utilizados los siguientes reactivos:

- Nitrato de plata (Panreac), puro, grado farma. Código del fabricante: 141459.
- Citrato de sodio 2-hidrato (Panreac), puro. Código del fabricante: A4522.
- Nitrato de potasio (LabKem), grado analítico, ACS. Código del fabricante: PONA-00A-500.

3.3- Procedimiento experimental:

3.3.1- Síntesis de nanopartículas por el método de Lee-Meisel:

Se siguió la síntesis detallada por Lee y Meisel [Lee & Meisel,1982]. Se prepara una disolución añadiendo 90 mg de nitrato de plata en 500 mL de agua. Se calienta hasta ebullición y se adiciona entonces gota a gota 10 mL de una disolución 10% en citrato sódico. Dejamos la mezcla en ebullición 1 hora aproximadamente. Se observará un cambio de color en la disolución que tornará de transparente a beige con una apariencia homogénea. Para una correcta conservación envolver el recipiente que contenga el coloide en papel de aluminio y conservar en un lugar protegido de la luz y la humedad.

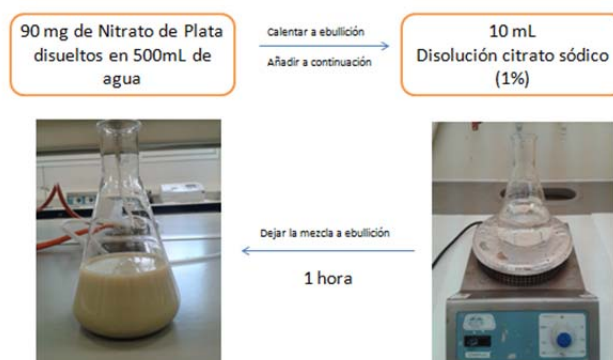


Ilustración 9. Síntesis del coloide Lee-Meisel

3.3.2- Registro de espectros SERS utilizando el coloide de Lee-Meisel.

En esta técnica es necesario diluir los colorantes para mantenerlos en estado líquido. En la siguiente tabla se muestra los disolventes utilizados para ello:

Tabla 5. Disolventes utilizados

Alizarina	Metanol
Sangre de dragón	Etanol:Agua (1:4)
Lac Dye	Etanol:Agua (1:3)

Se prepararon disoluciones de concentración 10^{-3} M para cada colorante para realizar los estudios posteriores.

En un portaobjetos de vidrio (ilustración 10) se añade un volumen adecuado del coloide y de colorante (el valor oscilará entre los 15 - 60 μ L dependiendo del colorante). Se coloca la muestra bajo el cabezal óptico y ajustándose la distancia al láser con la ayuda del videomicroscopio. Para evitar interferencias en la medida con la luz natural o con el sistema de iluminación del laboratorio se cubrirá el microscopio con un revestimiento que lo proteja de la misma.



Ilustración 10. Portaobjetos de vidrio

3.3.3- Síntesis “in situ” de nanopartículas y registro de espectros SERS:

Se seguirá el procedimiento descrito por El-Zahry y colaboradores [El-Zahry et al, 2013]. Para la síntesis se prepara una disolución 50 mM de nitrato de plata y 5 mM de citrato sódico. El calor necesario para la formación de las partículas de plata (a temperatura ambiente no se da la reacción ya que el citrato es un reductor suave) se suministra con el láser del espectrómetro Raman. El coloide es sintetizado a la vez que se realiza la medida: formación “in situ”.

Se prepara la disolución descrita en el apartado 2.3.1. Para utilizar este coloide se añade un determinado volumen de disolución nitrato de plata-citrato de sodio y el colorante disuelto sobre un portaobjetos cubierto con papel de aluminio. En esta etapa las partículas de plata encargadas del efecto SERS todavía no se han formado, se formarán cuando el láser irradie la muestra y la caliente.

Iremos realizando medidas sucesivas cada 3 minutos para ir viendo cómo se van formando las partículas y por consiguiente veremos la formación de las bandas que componen el espectro.

En este coloide la síntesis de las nanopartículas y el registro de espectros es simultáneo.

3.4- Muestras

Todos los compuestos estudiados en este trabajo fueron obtenidos a través de la casa comercial Kremer Pigmente. Se eligieron tres pigmentos de naturaleza inorgánica y otros tres de naturaleza orgánica, todos ellos con una tonalidad roja.

3.4.1- Pigmentos inorgánicos.

- Cinabrio: muestra comercial en formato de polvo rojo, envase de 10 gramos. Código del fabricante: 10620.12010.104. Es el principal mineral del que se extrae el mercurio. Es la forma cristalina roja del sulfuro de mercurio (HgS). Este pigmento fue utilizado desde la prehistoria en pinturas rupestres en muchas cuevas. Si este pigmento se obtiene de forma sintética se le conoce como Bermellón.



Ilustración 11. Cinabrio

- Cinabrio Monte Amiata: muestra comercial en formato de polvo rojo, envase de 10 gramos. Código del fabricante: 10610.12010.104. El Monte Amiata es un domo de lava situado en el sur de la región de Toscana (Italia) en el que hay una gran mineralización de cinabrio. Este cinabrio es sulfuro de mercurio pero contiene algunas impurezas fluorescentes.



Ilustración 12. Cinabrio Monte Amiatta

- Minio: muestra comercial en formato de polvo anaranjado-rojizo, envase de 50 gramos. Código de fabricante: 425009.12010.108. Es un óxido de plomo de color rojo o anaranjado. Utilizado desde los primeros pintores egipcios hasta la Edad Moderna. En la actualidad no se utiliza debido a su alta toxicidad.



Ilustración 13. Minio

3.4.2- Colorantes orgánicos.

- Sangre de dragón: muestra comercial en formato de polvo rojo. Código del fabricante: 37000.12100.136. Se obtiene al realizar un corte en la corteza de alguna especie vegetales tropicales (véase figura). De este proceso se obtiene un líquido viscoso rojo que se utiliza como materia prima para la fabricación de la muestra estudiada. Este pigmento a diferencia de los otros dos colorantes orgánicos estudiados es una mezcla de diversos componentes tales como catequinas, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, aunque dependiendo de la especie de la que se obtenga su composición puede variar ligeramente.

- Alizarina: muestra comercial en formato de polvo amarillo rojizo. Código de fabricante: 94100.12100.108. Su nombre químico es 1,2-dihidroxiantraquinona. Es uno de los diez isómeros de la dihidroxiantraquinona, dándose como sustitución de dos hidrógenos por grupos hidroxilo en la antraquinona.



Ilustración 14. Antraquinona y Alizarina

- Lac Dye: muestra comercial en formato de polvo rojo. Código del fabricante: 36020.12100.112. Colorante rojo extraído de la goma de Laca excretada por el insecto de la laca (habitual en el sudoeste de Asia). Muy usado en manuscritos y en pinturas de mediados del siglo XIX.



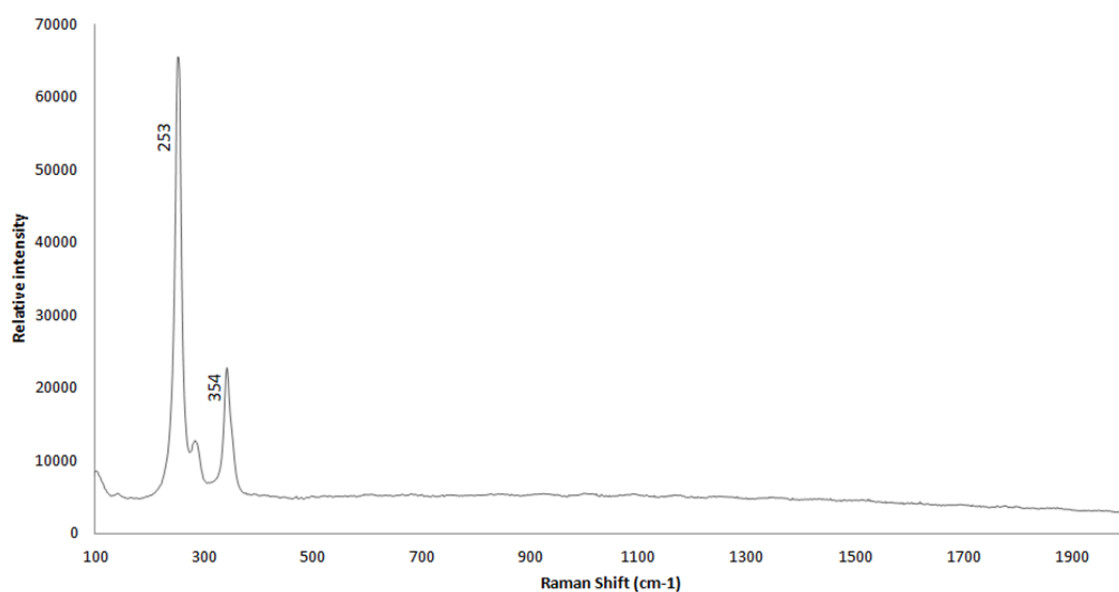
Ilustración 15. Colorantes orgánicos estudiados

4 - Discusión y resultados.

4.1 - Estudios preliminares: espectroscopia Raman convencional.

Se realizan medidas sobre una serie de pigmentos y colorantes en estado sólido. No realizamos ningún tipo de tratamiento de muestra en ninguna de la muestras.

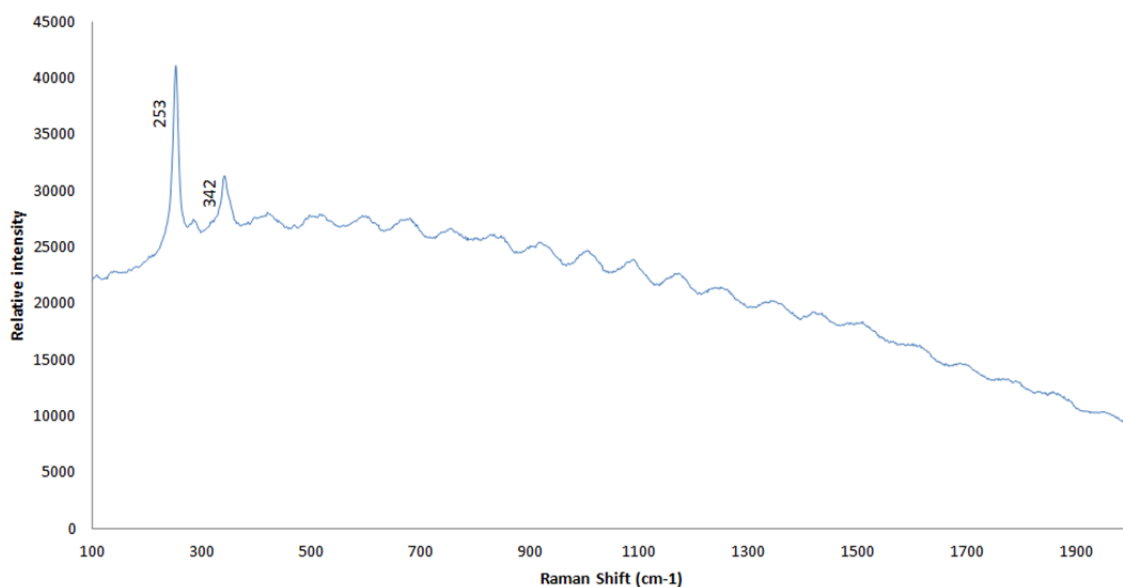
El primer pigmento estudiado es el Cinabrio.



Espectro 1. Cinabrio (sólido). [Realizado con 2% láser, 5 segundos de exposición y 1 acumulación]

Se observan unos picos muy bien definidos y sin ruido aun habiendo utilizado únicamente una acumulación.

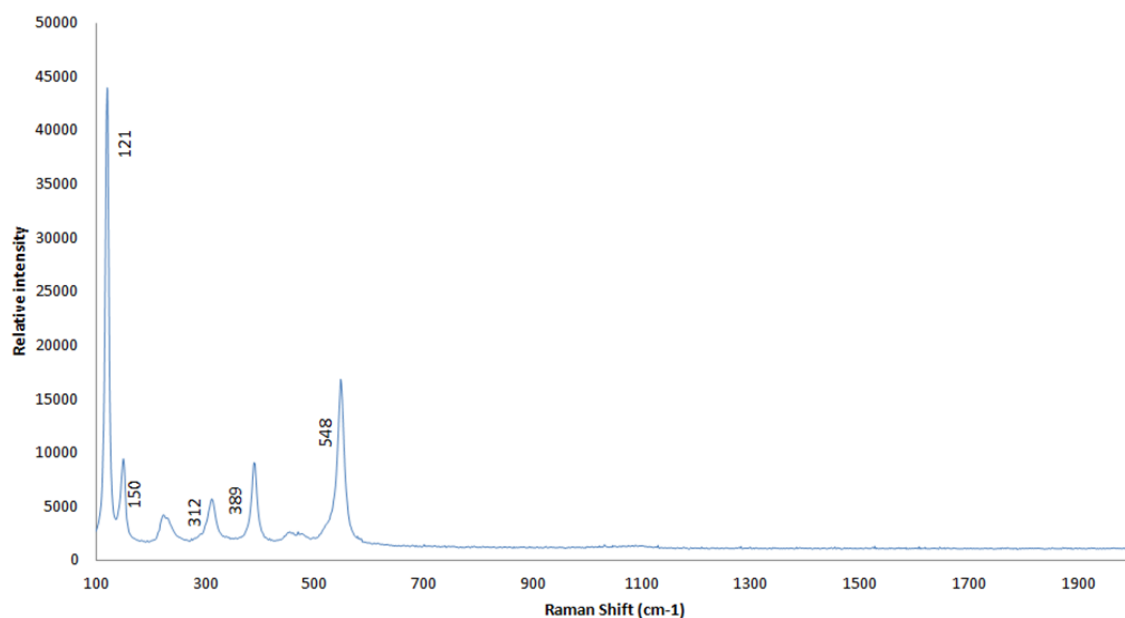
En segundo lugar se mide el Cinabrio del monte Amiatta.



Espectro 2. Cinabrio Monte Amiatta. *[Realizado con 2% láser, 1 segundo de exposición y 10 acumulaciones]*

Las bandas existentes son las mismas que en la muestra anterior (ya que son el mismo compuesto) observándose además fluorescencia debido a impurezas fluorescentes existentes en la muestra. Aún así esta fluorescencia no es suficientemente alta como para enmascarar el espectro.

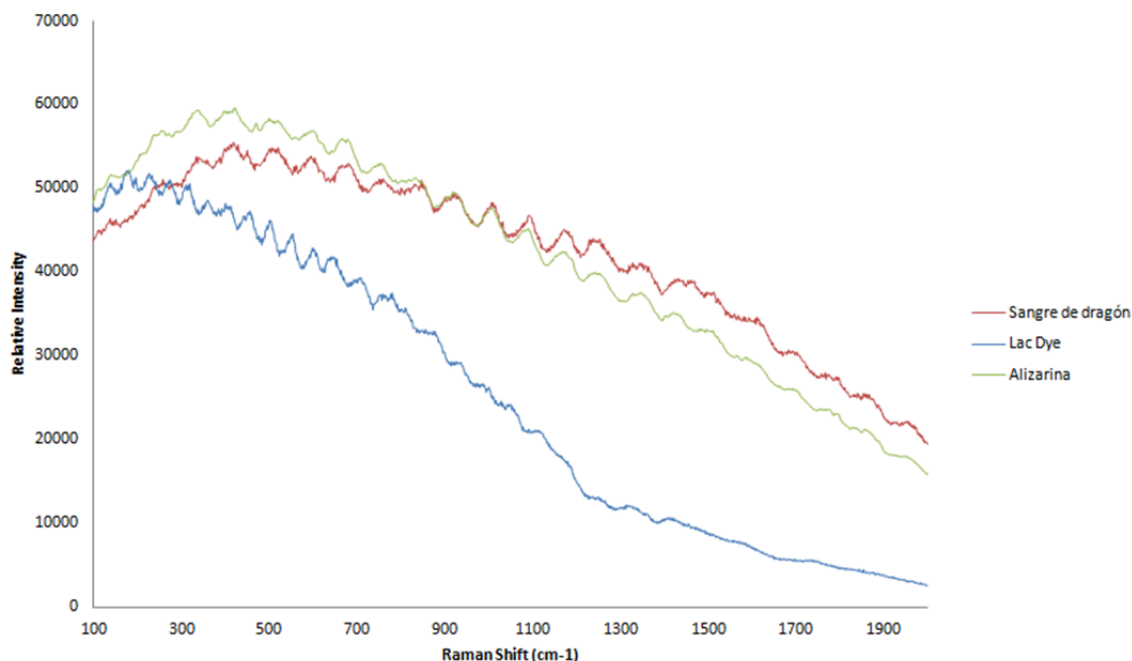
El siguiente pigmento inorgánico estudiado es el minio.



Espectro 3. Minio. *[Realizado con 2% láser, 2 segundo de exposición y 5 acumulaciones]*

Los pigmentos inorgánicos al no presentar fluorescencia pueden caracterizarse fácilmente a través de la espectroscopía Raman convencional sin necesidad de utilizar espectroscopía SERS.

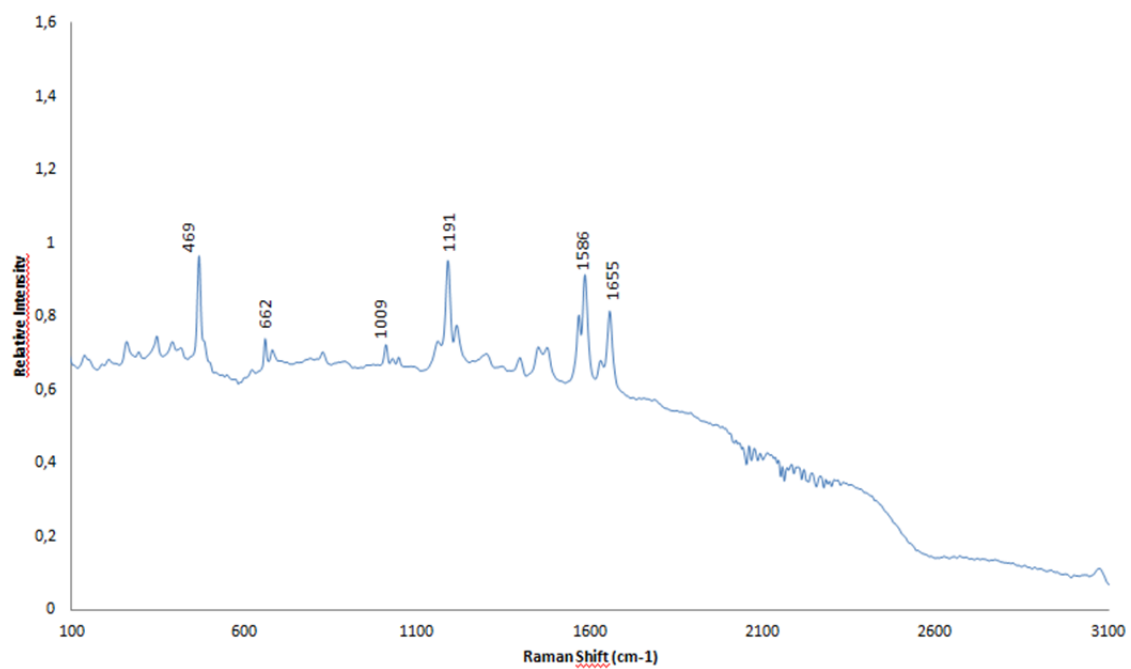
A continuación se realizan las medidas de los colorantes orgánicos sólidos.



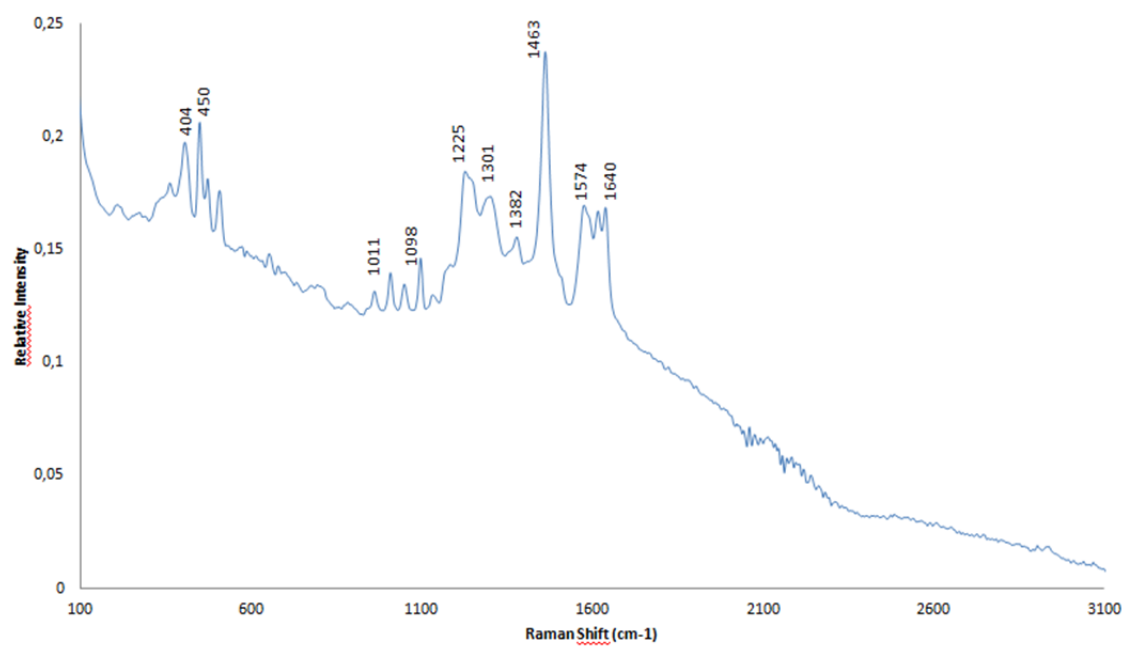
Espectro 4. Colorantes sólidos (Raman convencional)

Podemos observar en los tres colorantes orgánicos una gran cantidad de fluorescencia que solapa completamente con cualquier banda que pudiera observarse. Se hace latente la dificultad de caracterizar colorantes orgánicos a través de la espectroscopía Raman convencional. Es por ello que debemos utilizar la espectroscopia Raman sensibilizada en superficies (SERS) para superar esta dificultad.

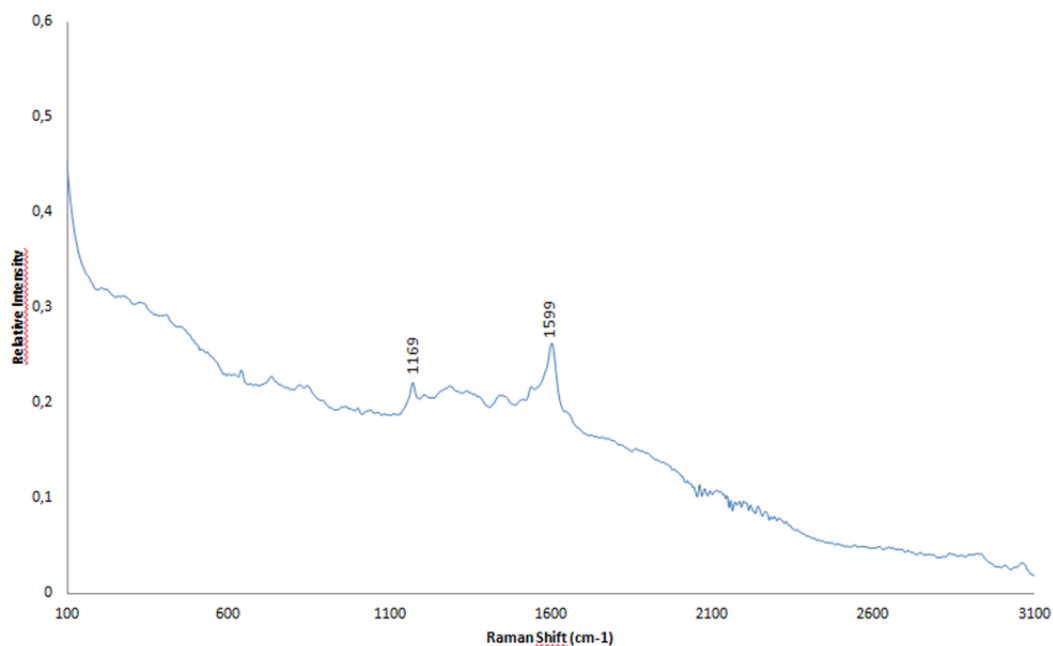
Se realiza un estudio previo de los tres colorantes orgánicos a través de FT-Raman para paliar el problema de la fluorescencia y comparar los resultados obtenidos con los obtenidos a través de SERS.



Espectro 5. Alizarina (FT-Raman).



Espectro 6. Lac Dye (FT-Raman)



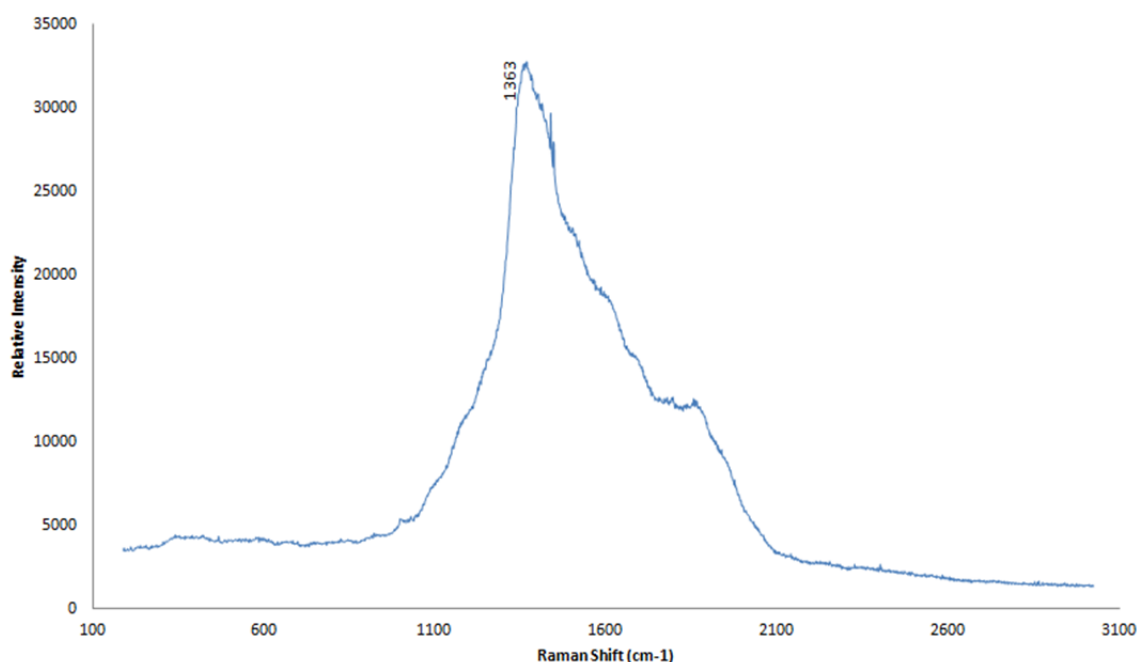
Espectro 7. Sangre de dragón (FT-Raman)

4.2- Espectroscopía Raman sensibilizada en superficie.

4.2.1- Coloide Lee-Meisel

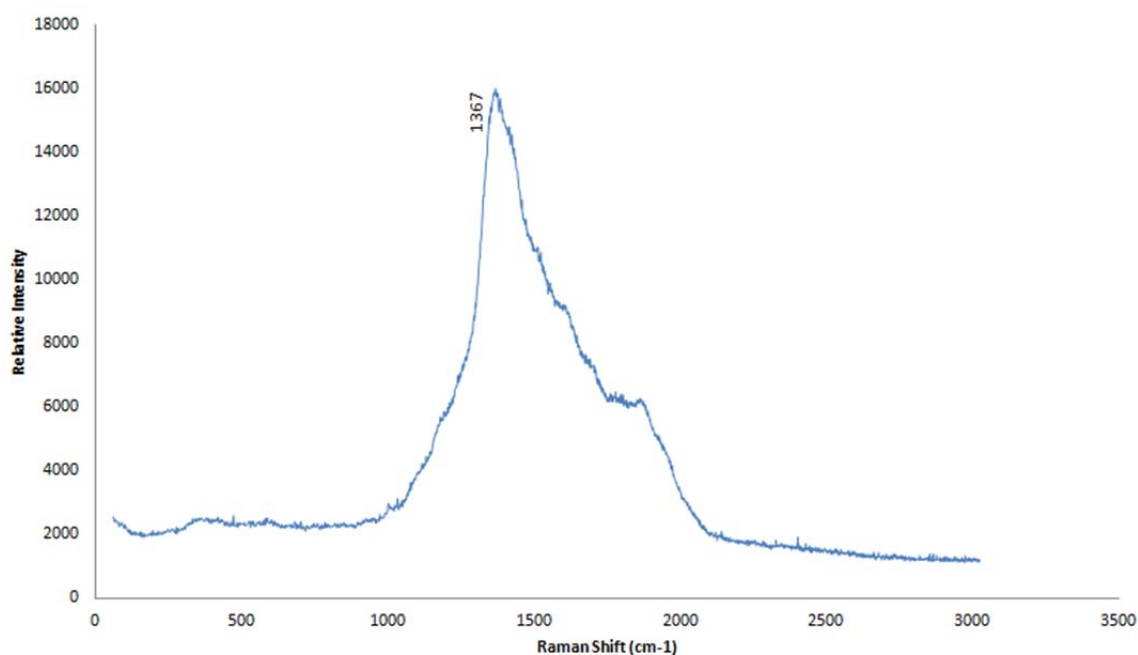
Una vez disueltos los colorantes y sintetizado el coloide Lee-Meisel (*ver apartado 3.3.1*) se procederá a realizar las medidas. Comenzamos con la alizarina

En un portaobjetos colocamos 15 μL de la disolución de alizarina y otros 15 μL del coloide Lee-Meisel y realizamos la primera medida (dejando un tiempo previo para que se produzca una interacción SERS efectiva), obteniendo el siguiente espectro:



Espectro 8. Primera medida alizarina

Observamos una banda muy ancha y amorfa. Sospechamos que pueda ser la señal procedente del vidrio del portamuestras. Por ello realizamos una medida sobre el vidrio para comprobarlo.



Espectro 9. Vidrio

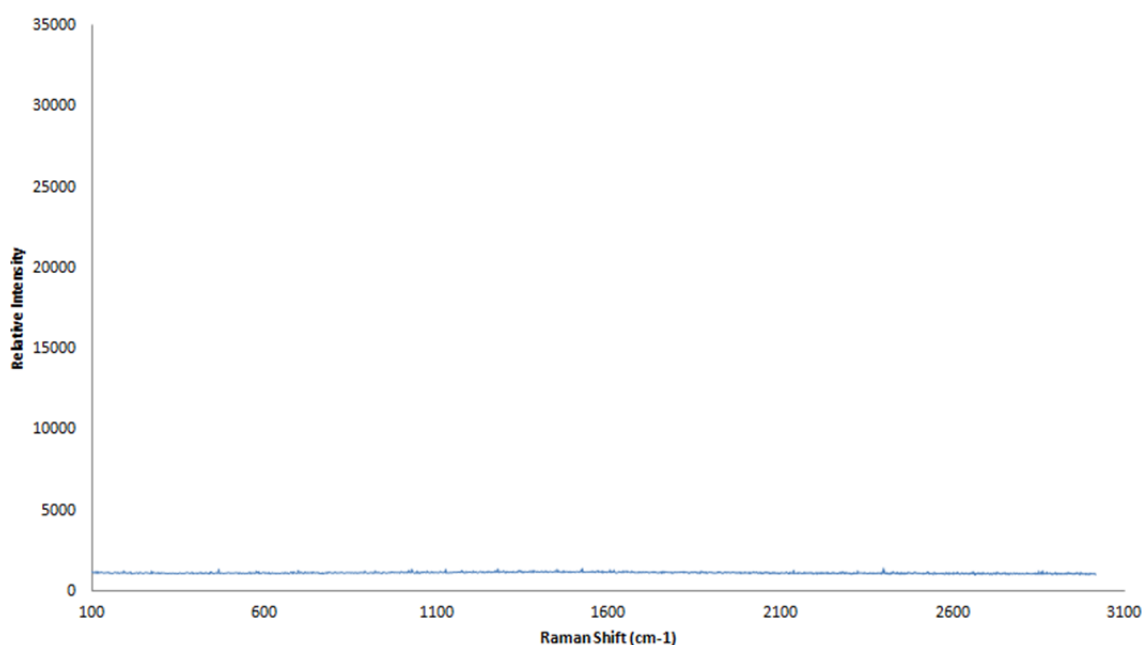
Se comprueba que la señal obtenida era debida al vidrio.

Podemos seguir unas técnicas para intentar que la señal de vidrio desaparezca:

- Añadir mayor volumen de coloide para favorecer la interacción SERS.

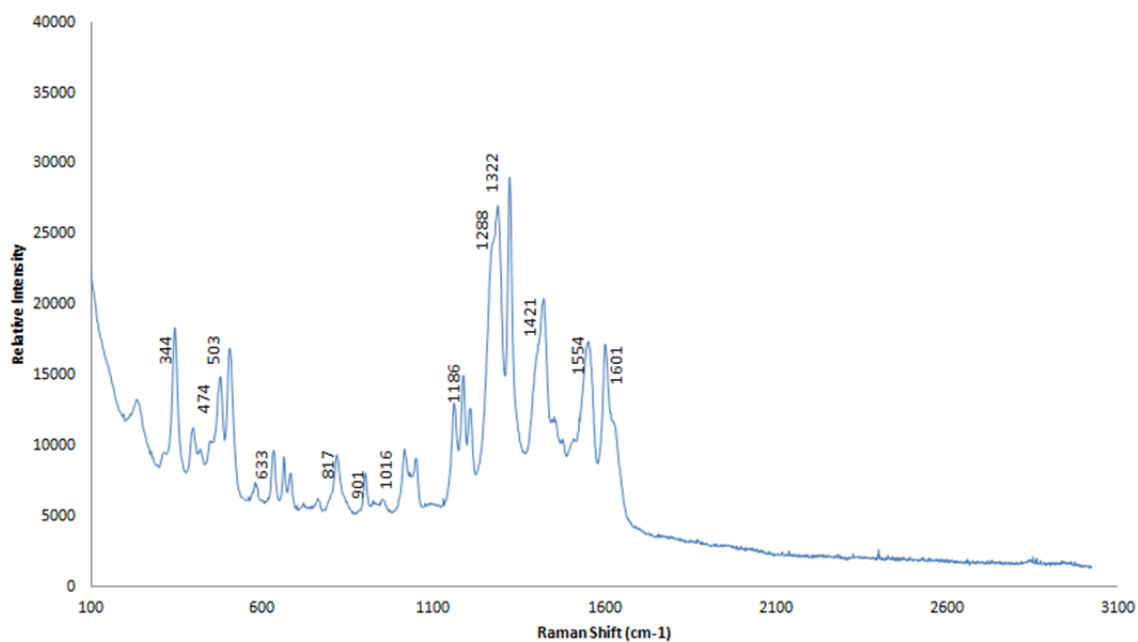
- Evaporar disolvente aumentando la potencia del láser y así aumente la concentración de colorante.
- Centrifugar el coloide para que precipiten todas las partículas de plata y redissolverlas en menor cantidad de disolvente.
- Recubrir el vidrio.

Se opta por cubrir el portaobjetos con algún material que no reaccione con la muestra ni con el coloide y a su vez no de señal Raman que pueda interferir con las bandas obtenidas. Utilizamos papel de aluminio. Antes de realizar ninguna otra medida realizamos un blanco sobre dicho papel.



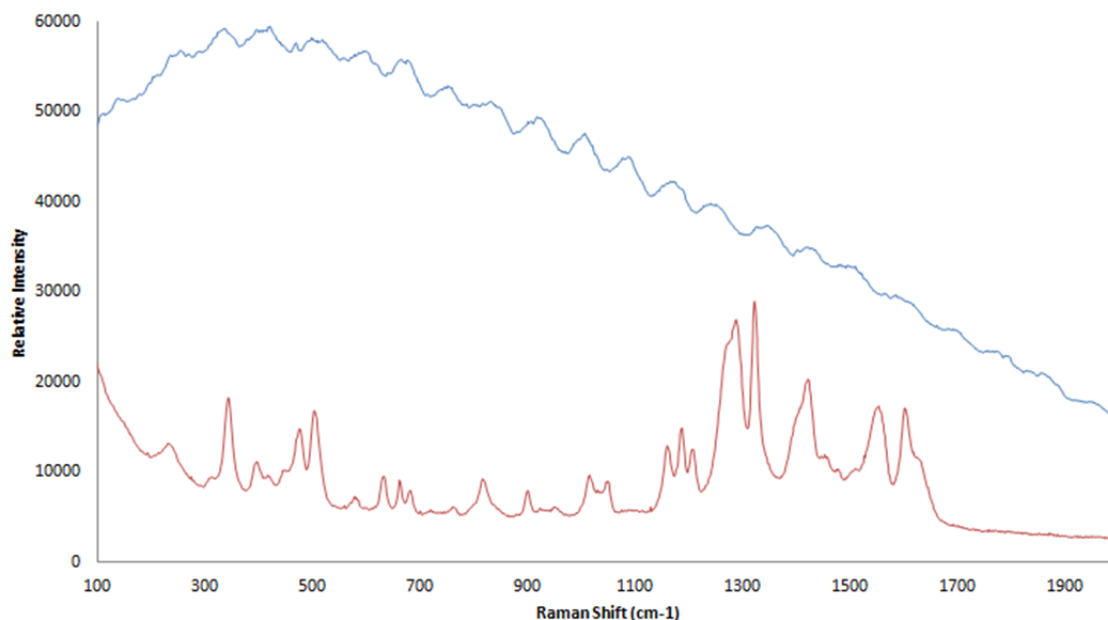
Espectro 10. Aluminio

Comprobamos que no da señal alguna por lo que procedemos a medir la Alizarina. Se añaden 15 μL coloide Lee-Meisel y otros 15 μL de la disolución de Alizarina.



Espectro 11. Alizarina (coloide Lee-Meisel). [Realizado con 15% láser, 10 segundos de exposición y 10 acumulaciones]

Se observa que a través de SERS podemos obtener las bandas del colorante utilizando un espectrómetro Raman dispersivo aún presentando la muestra fluorescencia. Comparando los espectros obtenidos a través de Raman y a través de SERS:

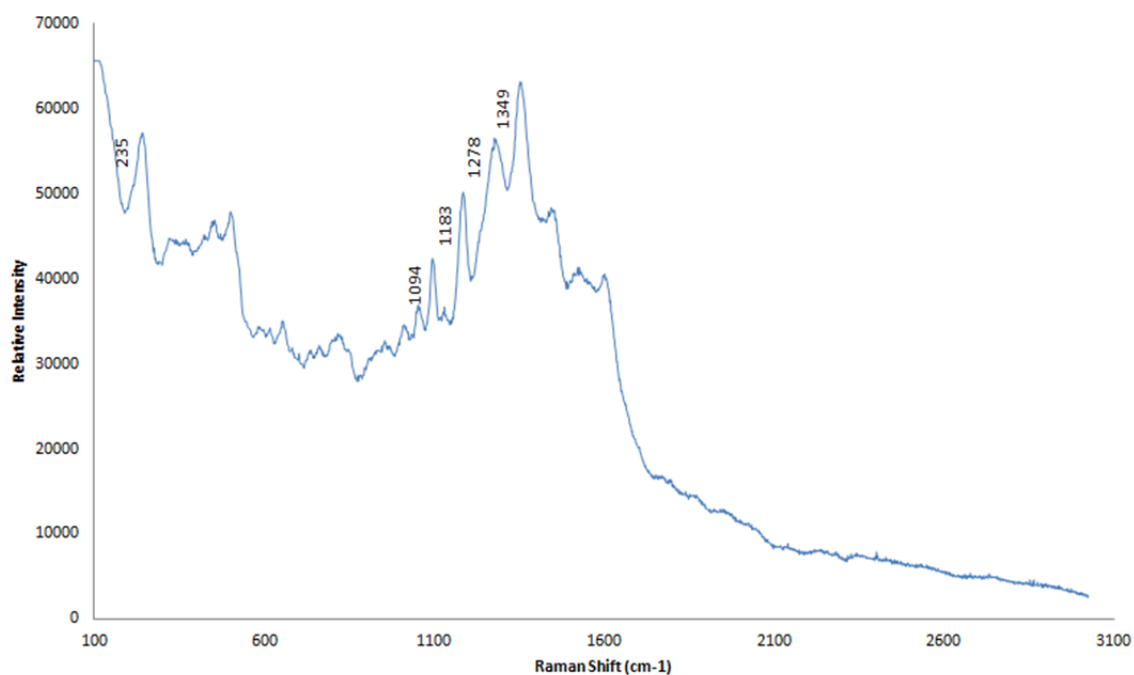


Espectro 12. Alizarina sólida VS Alizarina Lee-Meisel

Procedemos a estudiar el colorante Lac Dye.

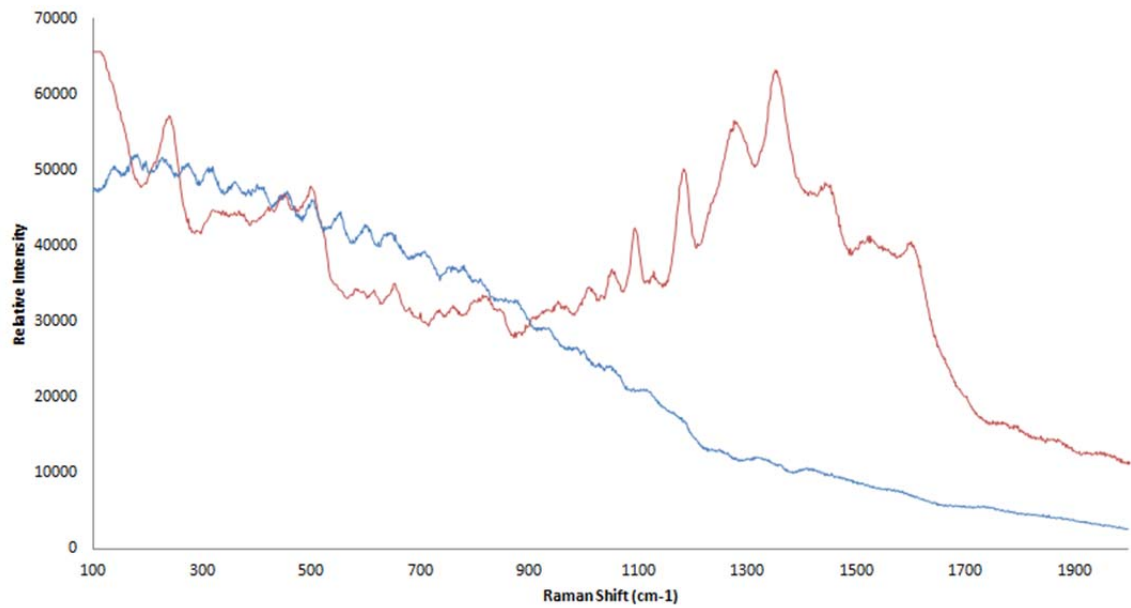
El procedimiento es el mismo que con la Alizarina solo que cambiando las condiciones experimentales.

Las condiciones en este caso son: 30 μL de disolución de Lac Dye y 45 μL de coloide Lee-Meisel.



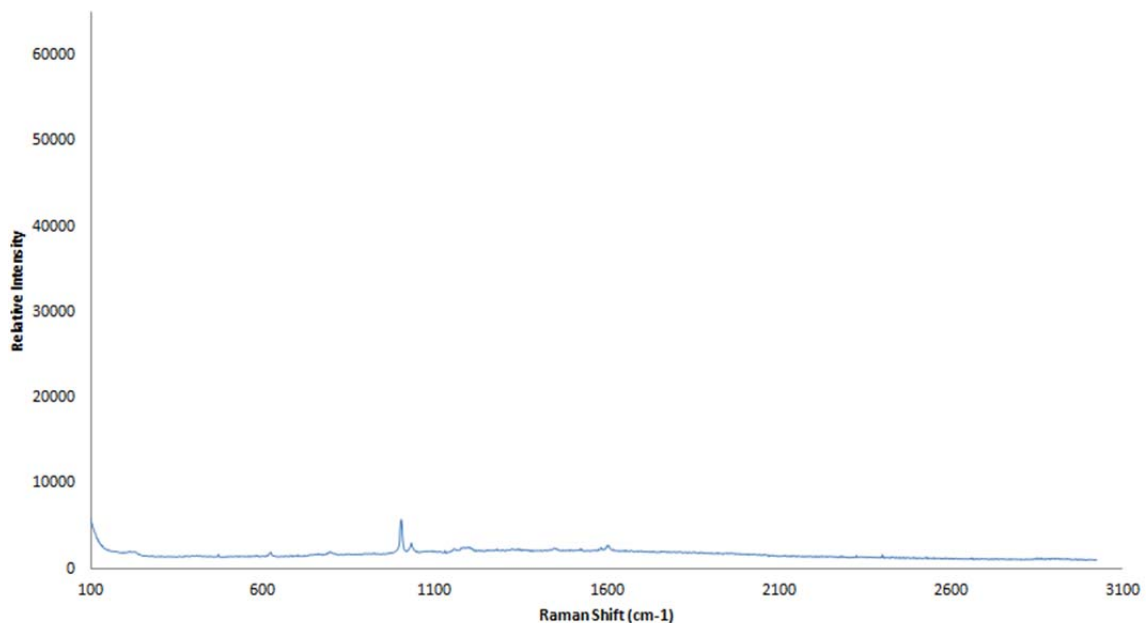
Espectro 13. Lac Dye (coloide Lee-Meisel). [Realizado con 15% láser, 15 segundos de exposición y 2 acumulaciones]

Comparando los resultados obtenidos con la espectroscopía Raman convencional y con el espectroscopía SERS:



Espectro 14. Lac Dye sólido VS Lac Dye Lee-Meisel

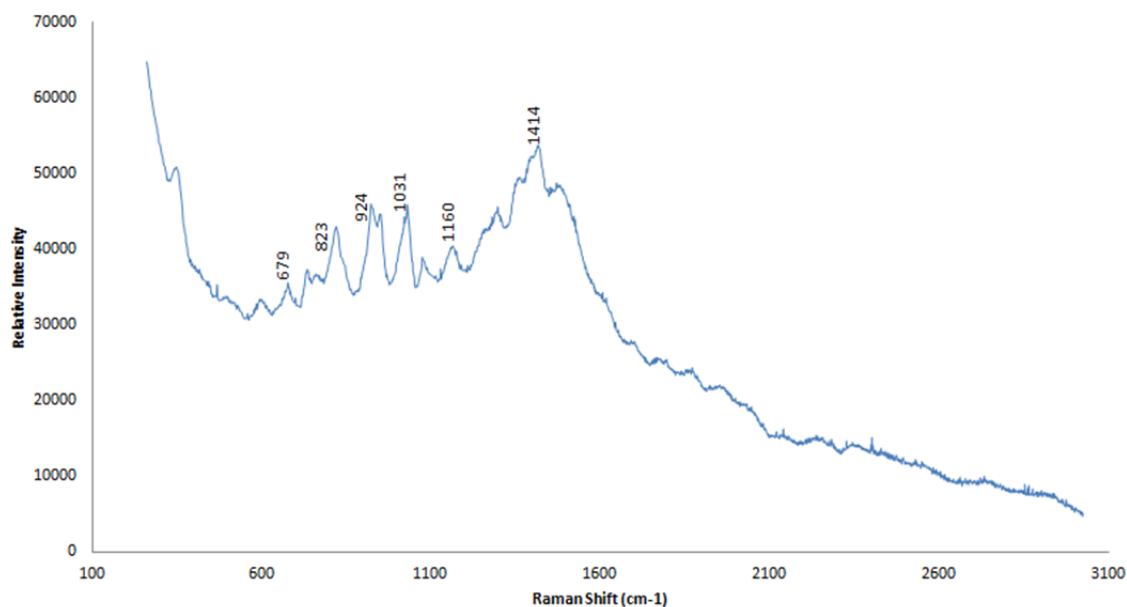
Terminamos estudiando el último colorante, la sangre de dragón (30 μ L disolución de sangre de dragón y 60 μ L de coloide Lee-Meisel).



Espectro 15. Sangre de Dragón. [Realizado con 20% láser, 30 segundos de exposición y 10 acumulaciones]

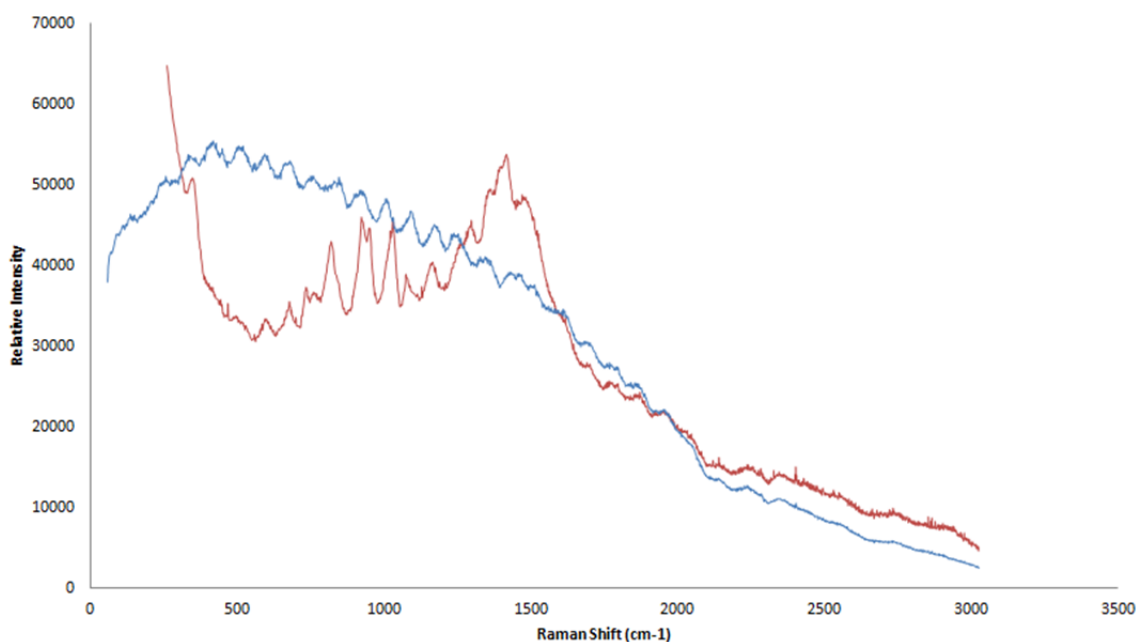
No se observa espectro alguno. Esto se debe a la interacción no efectiva entre las partículas del coloide y los componentes del pigmento. Para solucionar este problema se realizó una disolución acuosa de nitrato potásico de concentración 0,2 M. La función del nitrato potásico es favorecer la agregación del coloide

para así ayudar a que la interacción SERS se dé con mayor eficacia. Añadiendo 15 μL de dicha disolución y esperando 3-4 minutos volvemos a realizar la medida:



Espectro 16. Sangre de Dragón (coloide Lee-Meisel)

Comparando con el espectro obtenido sobre el colorante sólido:



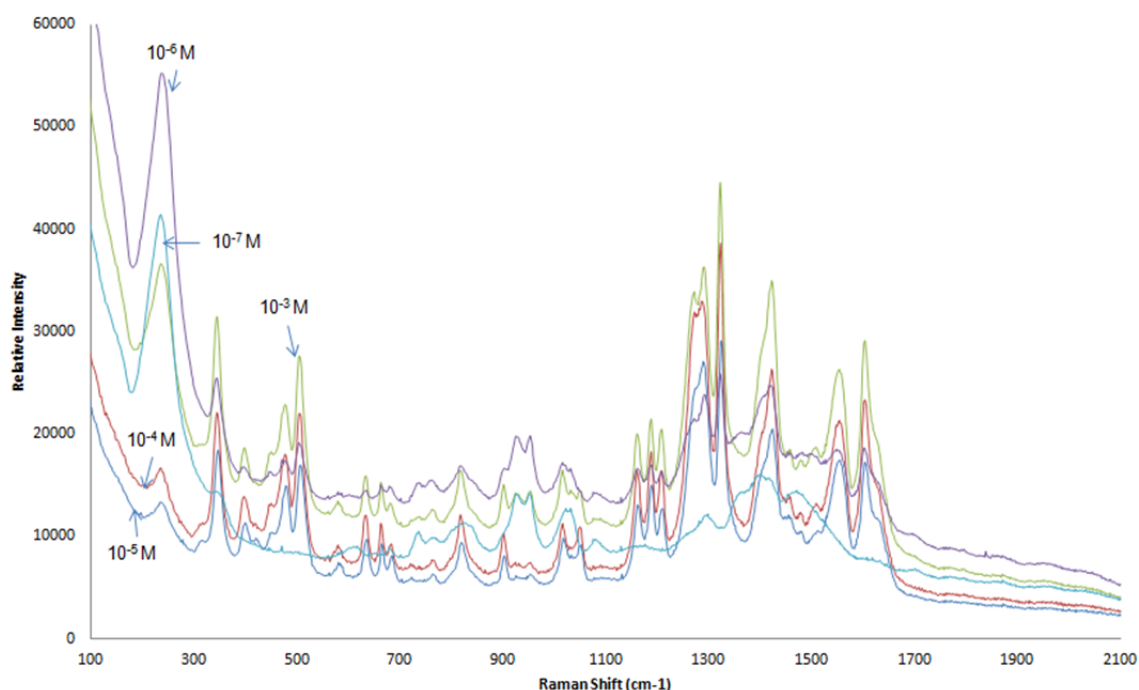
Espectro 17. Sangre dragón sólida VS Sangre dragón Lee-Meisel

Podemos concluir que la espectroscopía Raman sensibilizada en superficie elimina los problemas de fluorescencia que presentan la mayoría de colorantes orgánicos.

4.2.1.2 - Estimación de la concentración mínima detectable.

En este apartado se investigó cuál es la concentración mínima aproximada en la que tiene que estar el colorante para poder ser detectado con SERS. Para ello tomamos las disoluciones iniciales preparadas (recordando que su concentración es de 10^{-3} M) y prepararemos a partir de estas diluciones 1:10, de modo que obtendremos diluciones de concentración 10^{-4} M, 10^{-5} M y así sucesivamente. Estas muestras diluidas serán medidas con las mismas condiciones experimentales que la inicial e iremos estudiando como varían los espectros respecto a la concentración.

Realizaremos este estudio primeramente sobre la alizarina:



Espectro 18. Estudio de la influencia de la concentración

Cuando la concentración en alizarina está en torno a 10^{-7} M el espectro es inservible por lo que la concentración mínima que podemos detectar de alizarina en una muestra es 10^{-7} M demostrando así que la técnica SERS tiene una gran sensibilidad. Esta característica es muy importante debido a la baja concentración de analito muestras artísticas.

Se puede observar que la intensidad de las bandas no es proporcional a la concentración de alizarina en la muestra, por lo que con SERS no es posible realizar análisis cualitativos.

Si comparamos los espectros de las disoluciones más concentrada (10^{-3} M) y más diluida (10^{-7} M) se observan la existencia de bandas distintas. Esto se debe a efectos de orientación de la molécula sobre el sustrato metálico, es decir, cuando la concentración de alizarina es elevada las moléculas se colocan en posición perpendicular a la superficie metálica. Cuando la concentración disminuye, las moléculas de colorante pueden colocarse en otras posiciones respecto al metal y así intensificarse unas bandas respecto a otras.

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones mínimas de los tres colorantes estudiados:

Tabla 6. Concentraciones mínimas detectables

Alizarina	10^{-7} M
Lac Dye	10^{-5} M
Sangre de dragón	10^{-4} M

4.2.1.3 - Efecto del pH.

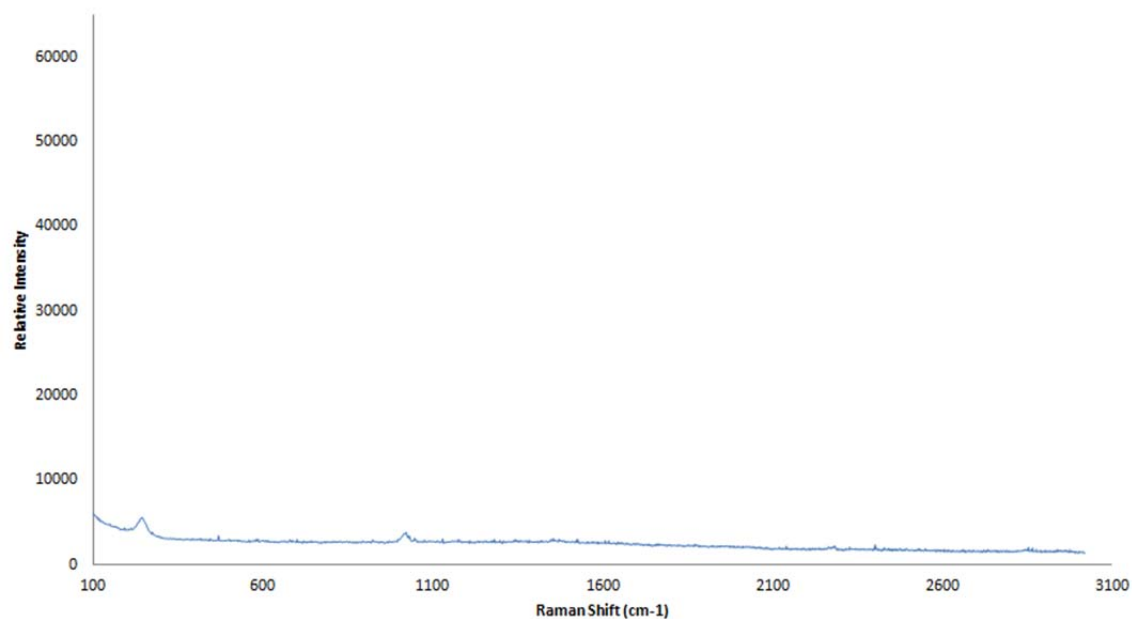
En este apartado se estudiará la influencia del pH en las bandas de los espectros. Para ello prepararemos para cada colorantes tres disoluciones a distintos pH (uno ácido, otro neutro y otro básico). El primer paso es medir el pH de las disoluciones iniciales:

Tabla 7. pH de los colorantes estudiados disueltos en agua

Alizarina	6.2
Lac Dye	3.0
Sangre de dragón	6.4

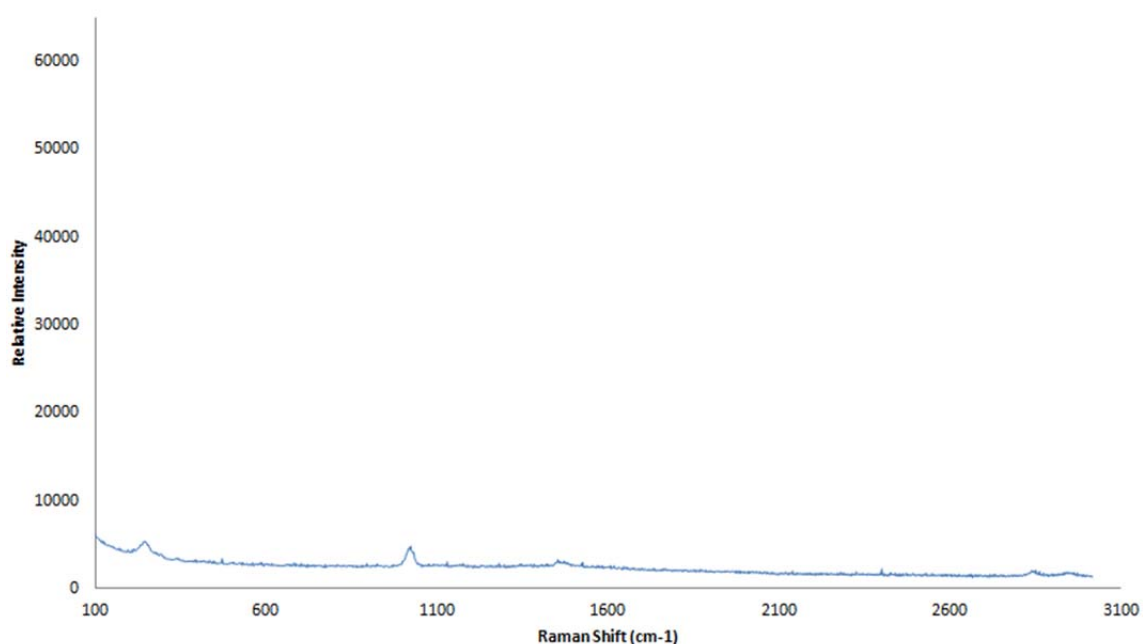
Para ajustar el pH de las disoluciones utilizaremos ácido clorhídrico e hidróxido sódico.

Comenzamos realizando la medida de la alizarina en medio ácido.



Espectro 19. Alizarina en medio ácido

Hay una desaparición completa de las bandas en el espectro. Al realizar la medida sobre la disolución medio básico:



Espectro 20. Alizarina en medio básico

Al mirar a través del microscopio vemos que las partículas de plata se han agregado sobre la superficie de la gota. Esto se debe a que el ácido clorhídrico y el hidróxido sódico son electrolitos fuertes (ácido y base fuerte), por lo que al añadirlos sobre la disolución hacemos que la fuerza iónica (indicativo de la concentración de todo ión disuelto en una disolución) aumente. Dado que la

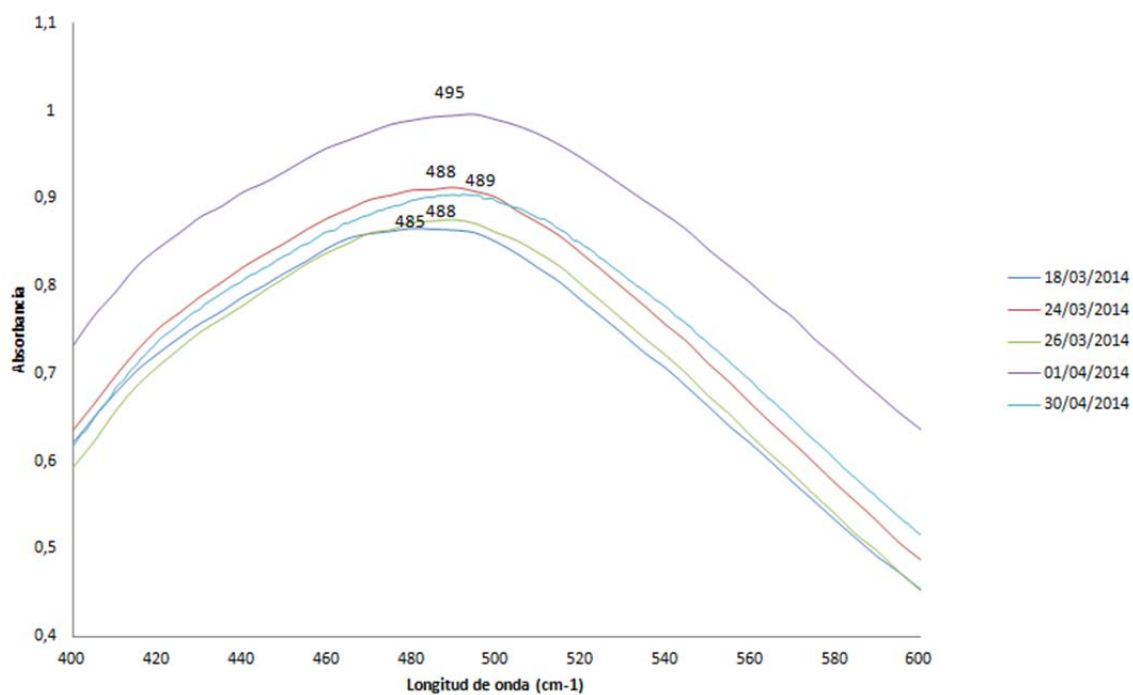
velocidad de agregación del coloide aumenta considerablemente con la fuerza iónica la agregación del coloide es normal.

Al no haber coloide las medidas realizadas son equivalentes a efectuar las medidas sobre el colorante disuelto.

Esto se traduce en una dificultad a la hora de realizar el tratamiento de muestra. Hay compuestos (denominados lacas) que para que puedan ser disueltos es necesario realizar una digestión en medio ácido o básico debido a que vienen sobre un sustrato insoluble. También habría que tener cuidado a la hora de realizar extracciones u alguna otra operación que varíe la fuerza iónica del medio.

4.2.1.4- Estabilidad del coloide Lee-Meisel.

Para estudiar la estabilidad del coloide sintetizado se mide el máximo de absorción en ultravioleta mediante espectrofotometría ultravioleta. Para ello es necesario realizar una dilución 1:5 con agua. La literatura indica que el coloide tiene el máximo de absorción a los 420 nm. Al realizar la medida sobre el coloide recién sintetizado observamos un máximo de absorción a los 480 nm. Aunque el coloide no posee las mismas propiedades que el sintetizado por Lee y Meisel lo utilizaremos para realizar el trabajo. Realizaremos medidas regulares para hacer un estudio sobre las propiedades del coloide. En caso de que el coloide se deteriore se procederá a realizar una nueva síntesis. Este coloide es estable en un intervalo de 2 meses.

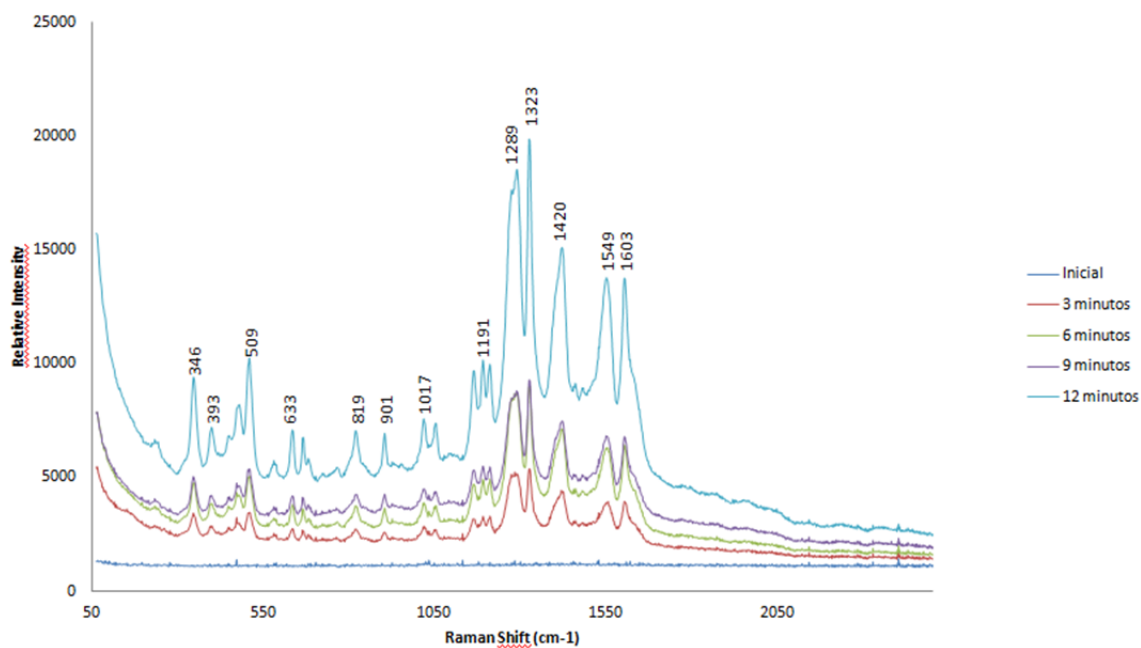


Espectro 21. Estudio de la estabilidad del coloide

El coloide se mantuvo estable en el periodo en el que se realizó el trabajo.

4.2.2 - Síntesis “in situ” de nanopartículas de plata

En este apartado estudiaremos la Alizarina y se comparará los resultados obtenidos con este coloide y con el coloide Lee-Meisel.

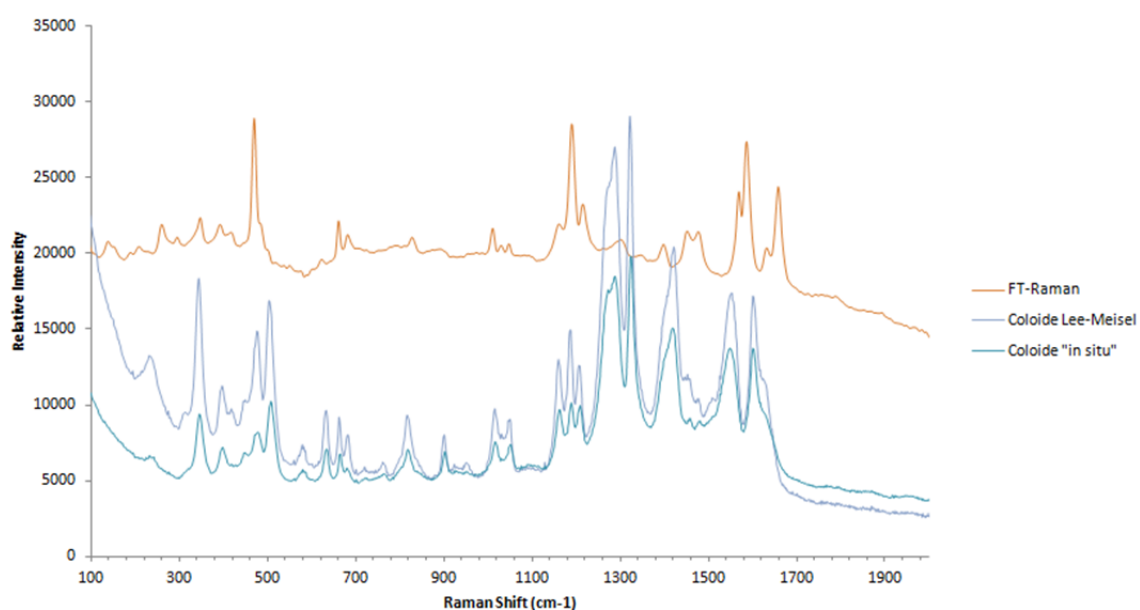


Espectro 22. Alizarina (coloide “in situ”)

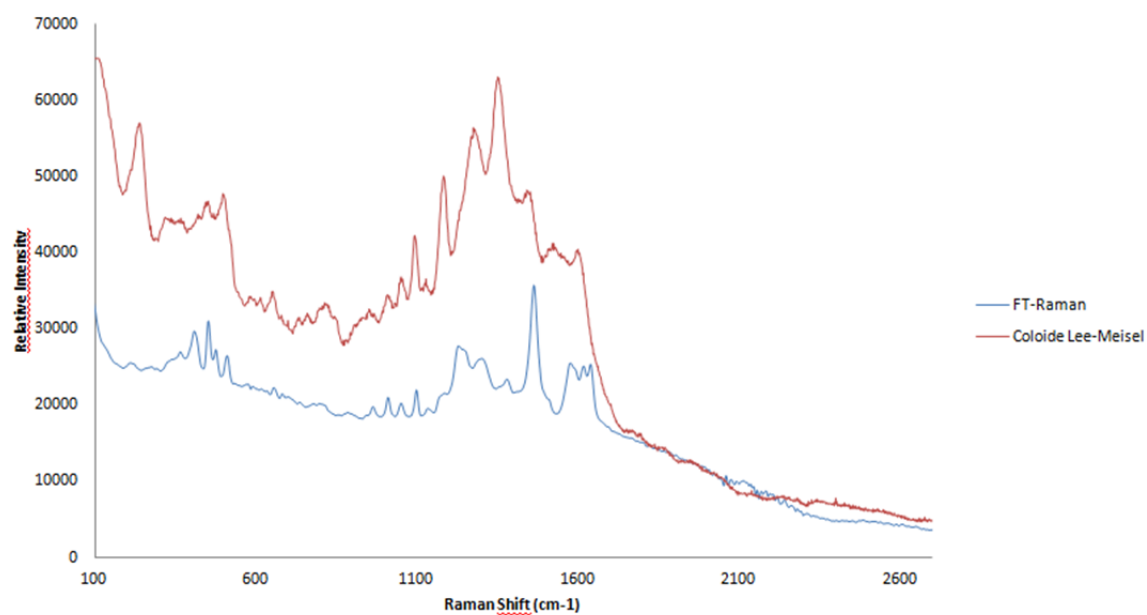
Acorde va pasando el tiempo vamos viendo la formación de las bandas debido a que la interacción SERS va siendo cada vez más efectiva debida a la formación progresiva del coloide.

4.3 - Comparación de métodos.

En este apartado vamos a realizar una comparación de los resultados obtenidos por los métodos utilizados (FT-Raman, Coloide Lee-Meisel y Coloide generado “in situ”)



Espectro 23. Comparación de los resultados obtenidos con Alizarina



Espectro 24. Comparación de los resultados obtenidos con Lac Dye



Espectro 25. Comparación de los resultados obtenidos con Sangre de Dragón.

Los mejores resultados se obtienen en los tres casos con la espectroscopia Raman sensibilizada en superficie que con FT-Raman debido a su poca

sensibilidad. Comparando los dos coloides utilizados en SERS ambos dan resultados parecidos ya que en esencia son el mismo coloide. La elección entre uno u otro dependería del trabajo a realizar. Si se va a realizar un estudio intensivo realizando medidas durante un corto intervalo de tiempo utilizaremos el coloide de Lee-Meisel. Si las medidas se van a realizar en momentos esporádicos sintetizaremos el coloide “in situ”.

5- Conclusiones

La espectroscopía Raman sensibilizada por superficie (SERS) es una alternativa a la hora de eliminar interferencias debidas a la fluorescencia. Además es una técnica muy sensible, característica imprescindible para este tipo de estudio en el que el colorante se utiliza de forma diluida. La preparación de la muestra es escasa y el registro de espectros es sencillo.

Otra alternativa es la espectroscopía Raman por transformada de Fourier (FT-Raman) pero debido a su baja sensibilidad no la hace idónea.

La intensidad de las bandas del espectro no es proporcional a la concentración del analito en la muestra por lo que no es posible realizar un estudio cuantitativo. Dependiendo de la orientación de la molécula respecto a la partícula metálica se ven intensificadas unas bandas respecto a otras.

Respecto a la estabilidad del coloide, la fuerza iónica del medio es determinante a la hora de la agregación del coloide. Una concentración alta de iones aumenta considerablemente la velocidad de agregación del coloide. Esto delimita la etapa de preparación de muestra. En condiciones óptimas de conservación el coloide de Lee-Meisel se mantiene estable durante aproximadamente 2 meses.

La generación del coloide “in situ” proporciona resultados similares al coloide Lee-Meisel. La elección entre un coloide u otro dependerá del tipo de trabajo a realizar.

6 - Bibliografía

Barja.B.G, Ruiz.M.S, López.G.A, Pérez.P.R, Soneira.F.M.J. “Análisis no destructivo de obras de arte con espectroscopía Raman”. *Buran* **2011**, 26, 1-10.

Brosseau.C.L , Casadio.F , Van Duyne.R.P. “Revealing the invisible: using surface-enhanced Raman spectroscopy to identify minute remnants of color in Winslow Homer’s colorless skies. *Journal of Raman Spectroscopy*”. **2011**, 42, 1305–1310.

Bruni.S, Guglielmi.V, Pozzi.F. “Historical organic dyes: a surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectral database on Ag Lee-Meisel colloids aggregated by NaClO₄”. *Journal of Raman Spectroscopy*. **2011**, 42, 1267–1281.

Chen.K, Leona.M, Vo-Dinh.T: “Surface-enhanced Raman scattering for identification of organic colorants in works of art and cultural heritage material”, *Sensor Review*. **2007**; 27, 109-120.

Creighton,J. A.; Blatchford,C.G.; Albrecht,M.G.. “Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength”. *J. Chem Soc. Farad. Trans. II*, **1979**, 75, 790–798.

Domingo.C, Cañamares.M.V, Jurasekova.Z , Puerto.E , Sánchez-Cortés.S, García-Ramos.J.V, “Aplicaciones de la espectroscopía SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) a la detección de pigmentos orgánicos naturales en objetos del Patrimonio Cultural”. *Plasmónica: detección sobre nanoestructuras metálica*. **2010**, 1, 197-230.

Domingo.C. “Técnicas de espectroscopía Raman aplicadas en conservación”. *La Ciencia y el Arte III, M. del Egido, D. Juanes (Eds.), IPCE, MCU, Madrid (2011)*.

Eastaugh.N, Walsh.V, Chaplin.T, Siddal.R. (2004). "Pigment Compendium. A dictionary of historical pigments". Ed: Elsevier

Edward.H.G.M, Chalmers.J.M. (2005). "Raman Spectroscopy in Archaeology and Art History". Ed. RSC, Londres.

El-Zahry.M.R, Genner.A, Refaat.I.H, Mohamed.H.A, Lendl.B. "Highly reproducible SERS detection in sequential injection analysis: Real time preparation and application of photo-reduced silver substrate in a moving flow-cell". *Talanta* **2013**, 116, 972-977.

Evanoff.D.D, Chumanov.G. "Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays". *ChemPhysChem* **2005**, 6, 1221 – 1231.

Garrido.C, Aliaga.A.E, Gómez-Jeria.J.S, Clavijo.R.E, Campos-Vallette.M.M, Cortés.S.S. "Adsorption of oligopeptides on silver nanoparticles: surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies". *Journal of Raman Spectroscopy*. **2010**, 41, 1149–1155.

Lee.P.C, Meisel.D.J: "Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols" *Physical Chemical*. **1982**, 86, 3391–3395.

Leona, M: "Microanalysis of organic pigments and glazes in polychrome works of art by surface-enhanced resonance Raman scattering", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2009**; 106, 14757-14762.

Leona.M, Decuzzi.P, Kubic.T.A, Gates.G, Lombardi.J.R: "Nondestructive identification of natural and synthetic organic colorants in works of art by surface enhanced Raman scattering", *Analytical chemistry*. **2011**; 83, 3990-3993.

Leona.M, Stenger.J, Ferloni.E: "Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art". *Journal of Raman Spectroscopy*. **2006**; 37, 981-992.

Mendoza.C.A, Nodarse.M.L, Calas.M,Alonso.H. "Análisis físico-químico de materiales artísticos de la pintura Colonización de México, Francisco Sans y Cabot". 1863. *Conserva* **2008**, 12, 55-68.

Monge.M. Nanopartículas de plata. "Métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas". *An. Quím.* **2009**, 105(1), 33-41.

Osticioli,I. Zoppi, A. y Castellucci, E. M. "Fluorescence and Raman spectra on painting materials: reconstruction of spectra with mathematical methods", *Journal of Raman Spectroscopy*. **2006**; 37, 974-980.

Otto. A. "What is observed in single molecule SERS, and why?". *Journal Raman Spectroscopy* . **2002**; 33, 593-598.

Rosi, F.; Paolantoni, M.; Clementi, C.; Doherty, B.; Miliiani, C.; Brunetti, B. G. y Sgamellotti, A. "Subtracted shifted Raman spectroscopy of organic dyes and lakes", *Journal of Raman Spectroscopy*. **2010**; 41, 452-458.

Sallum,L.F.; Soares, F.L.F.; Ardila, J.A, Carneiro, R.L. "Determination of acetylsalicylic acid in commercial tablets by SERS using silver nanoparticle-coated filter paper", *Spectrochimica Acta*. **2014**; 133,107-111.

Schlücker.S (**2011**). Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and life Science Applications. Ed:Wiley-VCH.

Smith.E, Dent.G. (**2006**): Modern Raman Spectroscopy. Ed: Wiley.

Stuart.B (**2008**): Analytical Techniques in Materials Conservation. Ed:Wiley.

Tian.Z.Q.. "Surface-enhanced Raman spectroscopy advancements and applications". *Journal of Raman Spectroscopy* . **2005**; 36, 466-470.

Vandenabeele. P (**2013**): Practical Raman Spectroscopy. Ed: Wiley.

Wustholz, K.L.; Brosseau, C.L.; Casadio, F. y Van duyne, R.P. "Surface-enhanced Raman spectroscopy of dyes: from single molecules to the artists' canvas", *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2009**; 11, 7350-7359.

Zhang, L.; Wang, B.; Zhu, G.; Zhou, X. "Synthesis of silver nanowires as a SERS substrate for the detection of pesticide thiram". *Spectrochimica Acta*. **2014**, 133, 411-416.