



Università  
Ca'Foscari  
Venezia

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche  
per la Conservazione e il Restauro  
(LM-54)

NANOMATERIALI AVANZATI  
PER L'ANALISI SERS DI COLORANTI  
USATI IN AMBITO ARTISTICO

Relatore:  
Prof. Paolo UGO

Laureanda:  
Margherita LONGONI  
Matricola 989440

Anno Accademico 2017 - 2018

# INDICE

## SOMMARIO

## ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

## 1.INTRODUZIONE

### 1.1 I coloranti rossi e le lacche

#### 1.1.1 Storia dei coloranti rossi

#### 1.1.2 I coloranti antrachinonici

#### 1.1.3 Carminio o cocciniglia

#### 1.1.4 Garanza o robbia

#### 1.1.5 Le lacche

#### 1.1.6 Metodi analitici classici per l'analisi di carminio e garanza

### 1.2 La spettroscopia Raman

#### 1.2.1 La spettroscopia vibrazionale

#### 1.2.2 Principi di spettroscopia Raman

#### 1.2.3 La spettroscopia SERS

##### 1.2.3.1 Proprietà ottiche dei metalli

##### 1.2.3.2 Intensificazione dell'effetto Raman e attenuazione della fluorescenza

##### 1.2.3.3 Meccanismo d'intensificazione dell'effetto SERS

##### 1.2.3.4 La spettroscopia SERS nell'analisi di coloranti organici

### 1.3. Nanomateriali per applicazioni SERS

#### 1.3.1 *Template Deposition* di metalli quasi-monodimensionali

##### 1.3.1.1 Deposizione elettrochimica

##### 1.3.1.2 Deposizione *electroless*

#### 1.3.2 Formazione di nanoparticelle sferiche e di diversa geometria

#### 1.3.3 Aggregazione delle nanoparticelle

#### 1.3.4 Formazione di nanostrutture gerarchiche

## **2. PARTE SPERIMENTALE**

### 2.1 Materiali: reagenti chimici e coloranti impiegati

### 2.2 Preparazione dei substrati metallici

#### 2.2.1 Sintesi di nanostelle d'argento

#### 2.2.2 Deposizione *electroless* di nanofili d'oro (AuNWs)

##### 2.2.2.1 Fabbricazione di NEEs (Nano Electrodes Ensemble)

#### 2.2.3 Metodologie elettrochimiche

#### 2.2.4 Deposizione elettrochimica di nanofili di rame (CuNWs)

##### 2.2.4.2 Deposizione di CuNWs in membrane di policarbonato

##### 2.2.4.3 Deposizione di CuNWs in membrane di allumina

##### 2.2.4.4 Ottimizzazione del sistema

### 2.3 Preparazione dei campioni

#### 2.3.1 Benzentiolo

#### 2.3.2 Coloranti rossi

#### 2.3.3 Mock-up di rosso carminio e lacca di garanza

### 2.4 Strumentazione impiegata

#### 2.4.1 Spettrometro Raman

#### 2.4.2 Microscopi a scansione elettronica SEM-EDX, FE-SEM e TEM

#### 2.4.3 Spettrofotometro UV-Vis

#### 2.4.4 Potenzio stato

## **3. RISULTATI**

### 3.1 Nanoparticelle e nanofili: analisi e caratterizzazione

#### 3.1.1 Nanostelle di argento

#### 3.1.2 Nanofili di oro

##### 3.1.2.1 Caratterizzazione elettrochimica dei NEEs

- 3.1.3 Nanofili di rame
  - 3.1.3.1 Studio voltammetrico della riduzione  $\text{Cu}^{2+}$
  - 3.1.3.2 Ottimizzazione del sistema
  - 3.1.3.3 CuNWs in policarbonato
  - 3.1.3.4 CuNWs in allumina
- 3.2 Amplificazione Raman della sonda benzenotiole adsorbito sulle nanostrutture
  - 3.2.1 SERS su substrati a base d'oro
  - 3.2.2 SERS su substrati a base di rame
  - 3.2.3 Discussione dei risultati sul benzenotiole
- 3.3 Studi SERS su coloranti d'interesse artistico
  - 3.3.1 Rosso carminio
    - 3.3.1.1 Interazione fra rosso carminio e substrati SERS
    - 3.3.1.2 Spettri SERS del rosso carminio
  - 3.3.2 Lacca di Garanza
    - 3.3.2.1 Interazione fra lacca di garanza e substrati SERS
    - 3.3.2.2 Spettri SERS della lacca di garanza
  - 3.3.3 Discussione dei risultati sui coloranti
- 3.4 Analisi di mock-up: uno sviluppo futuro

## **4. CONCLUSIONI**

### **APPENDICI**

APPENDICE A. Tecniche analitiche impiegate

APPENDICE B. Misure voltammetriche sulle soluzioni di solfato di rame

APPENDICE C. Spettri Raman di riferimento

### **BIBLIOGRAFIA**

## SOMMARIO

L'analisi dei materiali costituenti le opere d'arte rappresenta nell'ambito della diagnostica dei beni culturali un compito di fondamentale importanza: la conoscenza delle sostanze con cui gli oggetti sono stati realizzati è infatti indispensabile per la loro comprensione e valorizzazione, oltre a fornire interessanti informazioni sul loro passato. In particolare, molte notizie possono essere tratte dalla caratterizzazione dei coloranti organici: da un punto di vista storico risalire alla fonte di estrazione permette di scoprire quali risorse erano disponibili in una certa epoca ed in una determinata area geografica, fornendo interessanti indicazioni di carattere antropologico; in ambito artistico il riconoscimento dei materiali può invece aiutare a comprendere la tecnica pittorica dell'artista e la sua evoluzione, nonché a datare i manufatti stessi, portando talvolta al riconoscimento di falsi e contraffazioni; infine, dal punto di vista del conservatore, le analisi scientifiche applicate allo studio dei coloranti permettono di interpretare i fenomeni di degrado orientando in tal modo gli interventi di conservazione e restauro.

Tuttavia, l'identificazione dei coloranti storici costituisce uno dei compiti più ardui nell'ambito del riconoscimento dei materiali d'interesse artistico. Questi ultimi si trovano infatti generalmente miscelati ad altre sostanze quali leganti e mordenti, con cui interagiscono a formare un sistema complesso. Inoltre, in virtù del loro elevato potere tintorio venivano utilizzati in bassissima concentrazione, fattore che, unitamente al fatto che i campioni provenienti da opere d'arte, se disponibili, sono sempre di dimensione microscopica, porta alla necessità di disporre di una tecnica analitica di identificazione ultra sensibile.

Ad oggi le tecniche convenzionalmente impiegate per l'identificazione dei coloranti organici sono le cromatografiche liquida (HPLC o GC eventualmente abbinata a spettrometria di massa), la spettrofotometria UV-Vis e le spettroscopie vibrazionali. Il primo metodo, sebbene molto specifico ed utile per il riconoscimento dei coloranti anche in caso di miscele, è distruttivo e richiede un quantitativo di campione relativamente grande, di rado disponibile quando si ha a che fare con opere d'arte. La seconda tecnica gode invece di scarsa specificità degli spettri, caratterizzati da bande larghe e da lunghezze d'onda d'assorbimento simili per sostanze di colorazione analoga, e risente fortemente dell'interferenza della matrice. Neppure le tecniche spettroscopiche vibrazionali risultano di facile applicazione per l'identificazione dei coloranti organici. Questi ultimi sono infatti

difficilmente riconoscibili mediante spettroscopia IR in quanto i segnali corrispondenti risultano oscurati da quelli della fibra tessile o del legante pittorico, mentre la spettroscopia Raman tradizionale, pur essendo da un punto di vista teorico la tecnica più promettente per l'identificazione di queste molecole organiche presenti in minima quantità, risente della bassa intensità dei segnali e dell'elevata fluorescenza.

Una valida soluzione a questi problemi è offerta dalla spettroscopia SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*). Questa tecnica si basa sull'adsorbimento delle molecole di analita su una superficie metallica nanostrutturata e permette sia di amplificare l'intensità del segnale Raman sia di ridurre sostanzialmente la fluorescenza. La presenza di nanoparticelle metalliche (specialmente d'argento, oro o rame) può infatti rendere il segnale di diffusione Raman più intenso, incrementandolo fino ad un ordine di grandezza di  $10^{-6}$  e assorbendo nel contempo la maggior parte dei fotoni di fluorescenza emessi dalle molecole.

Il presente lavoro di tesi è stato pertanto dedicato alla preparazione e caratterizzazione di nanoparticelle e nanomateriali impiegabili come nuovi substrati SERS con l'obiettivo di migliorare il limite di rivelabilità della tecnica e di renderla applicabile per il riconoscimento di coloranti organici a campioni provenienti da opere d'arte. A tal proposito sono state preparate e confrontate nanostrutture gerarchiche composte da nanofili in rame o in oro su cui sono state immobilizzate nanoparticelle d'argento a forma di stella; teoricamente è infatti possibile ottenere un ancor più intenso Raman enhancement impiegando sistemi compositi di nanomateriali (Kwan K. et al., 2005).

Nella prima parte del lavoro di tesi particolare attenzione è stata posta all'ottimizzazione dei metodi di deposizione elettrochimica per ottenere nanofili d'oro e di rame. La seconda è stata dedicata alla sperimentazione di questi nuovi nano materiali per ottenere strutture gerarchiche da utilizzare come substrati SERS. Le analisi SERS sono state eseguite dapprima su una molecola sonda che produce un segnale Raman notoriamente intenso, il benzotriolo o tiofenolo, dopodiché il nano materiale gerarchico che si è rivelato migliore è stato usato per analizzare due coloranti rossi d'interesse artistico, il rosso carminio (o cocciniglia) e la lacca di garanza (o robbia). Per concludere, in vista della futura prospettiva di applicare il sistema all'analisi di campioni reali sono state condotte alcune analisi preliminari su mock-up di stesure pittoriche a base di rosso carminio e lacca di garanza realizzati utilizzando la tecnica pittorica ad olio e a tempera.

## ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

AAO = Ossido di alluminio anodizzato

AgNPs = Nanoparticelle d'argento

AgNSs = Nanostelle d'argento

AuNWs = Nanofili d'oro

BT = Benzentiolo

CuNWs = Nanofili di rame

CV = Voltammetria ciclica

DCM = Diclorometano

EDX = Energy Dispersive X-Ray

(FE-) SEM = (Field Emission-) Scanning Electron Microscope

GC = Glassy carbon

LFIEF = Local Field Enhancement Factor

LSPR = Local Surface Plasmon resonance

NEEs = Nano Electrodes Ensemble

NPs = Nanoparticelle

NWs = Nanofili

PC= Policarbonato

SERS = Surface Enhanced Raman Spectroscopy

TEM = Transmission electron Microscope

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 I Coloranti rossi e le lacche

### 1.1.1 Storia dei coloranti rossi

Sin dalla preistoria l'uomo ha usato colori e coloranti per decorare i propri oggetti e per creare immagini: le sostanze colorate venivano infatti applicate ad una vasta gamma di superfici, diventando parte integrante di un gran numero di manufatti. Prima dell'avvento della chimica e dell'industria dei coloranti sintetici, tutte le sostanze impiegate traevano origine dalla natura. Venivano infatti ricavate da fonti di origine minerale, vegetale - quali radici, bacche, legni e foglie - o animale, ad esempio da insetti o molluschi. Nel corso dei secoli il progressivo sviluppo dell'arte tintoria fece conoscere quali famiglie di piante e quali animali fossero particolarmente ricche di un determinato colorante ed indicate per ottenere una determinata tinta.

Tra tutte le cromie il colore rosso è stato sin dall'antichità insignito di una grande valenza simbolica e caricato di molti significati. A testimonianza di ciò la porpora di Tiro, introdotta in Asia Minore dai fenici nel XV secolo a.C. e successivamente importata presso Greci e Romani, rappresenta il più prezioso ed antico dei coloranti rossi e il suo nesso con la regalità è ormai diventato leggendario. Anche nel corso del Medioevo il rosso continuò a preservare il suo primato: i tessuti più fini erano infatti quelli rosso cupo, generalmente ottenuti con l'estratto dell'insetto Kermes o della Cocciniglia, i coloranti delle lacche Carminio, descritto da un manuale fiorentino per tintori del XV secolo come «il primo e il più alto e il più importante colore che abbiamo». Accanto a queste sostanze d'origine animale, ricercate per la loro brillantezza e stabilità nel tempo, veniva inoltre impiegata una vasta gamma di coloranti rossi d'origine vegetale, quali la garanza, ricavata dalle radici della *Rubia tinctorum*, il Legno del Brasile e l'orceina, estratti rispettivamente dalla *Caesalpinia echinata* e dalla *Roccella tinctoria*. Questi ultimi tuttavia, estremamente labili e sensibili alla luce, venivano tradizionalmente impiegati per tingere tessuti di poco pregio come la lana.

Nel 1820 due chimici francesi, Jean-Jacques Colin e Pierre Robiquet, isolarono dalla radice della robbia un composto rosso che riconobbero come l'ingrediente principale della tintura: lo chiamarono alizarina dal nome arabo della pianta, *alizari*. L'estratto della radice conteneva



anche un secondo composto affine che battezzarono purpurina, a cui, nonostante il nome, si doveva la lieve sfumatura arancio del colorante naturale. Nel 1850 era stata individuata la formula chimica dell'alizarina e si cercava di trovare un modo per sintetizzarla chimicamente riducendo il costo rispetto al colorante estratto dalla pianta. Dopo numerosi tentativi, trascorsi alcuni anni, venne scoperto il processo a tre stadi per sintetizzare l'alizarina, una molecola identica al prodotto naturale, ma ottenuta con mezzi artificiali. L'alizarina sintetica era estremamente brillante e ben presto divenne anche più economica di quella naturale, che scomparve progressivamente. Nel corso del XIX secolo la possibilità di disporre con facilità tinture commerciali a basso costo prodotte mediante opportuni procedimenti di sintesi, determinò un declino dei rossi ed in generale di tutti i colori di origine naturale. A ciò si aggiunse il progressivo abbandono da parte dei nobili di stoffe e paramenti scarlatti, per privilegiare i più 'elitari' nero, blu, grigio e i colori pastello. (Ball, 2001)

I coloranti rossi restano tuttavia di fondamentale importanza nel campo dell'archeologia e della storia dell'arte, dove hanno trovato un vasto campo di applicazioni. Vennero infatti impiegati non solo per la realizzazione di dipinti e per la tintura dei tessuti, ma anche per la creazione di inchiostri colorati e acquarelli e per la decorazione di svariati oggetti d'uso quotidiano. Molti di questi manufatti sono al giorno d'oggi entrati a far parte delle collezioni museali e la conoscenza dei materiali con cui sono stati realizzati può contribuire alla loro comprensione ed apprezzamento, così come fornire una panoramica del loro passato. (Hofenk de Graaff, 2004)

### **1.1.2 I coloranti antrachinonici**

Da un punto di vista chimico, i principali coloranti rossi appartengono alla famiglia degli antrachinoni.

Gli antrachinoni rappresentano la più numerosa famiglia dei chinoni. Si tratta di composti organici derivati dalla struttura dell'antracene, in cui i gruppi metinici =CH- in posizione 9 e 10 sono sostituiti da due gruppi chetonici -C=O.

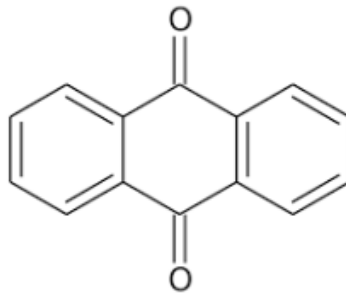


Figura 1.1: Struttura chimica base dell'antrachinone.

Questa sostituzione porta l'anello aromatico centrale a diventare un dione ciclico coniugato, caratteristica che, unitamente alla presenza dei due gruppi chetonici in una serie di doppi legami coniugati, è fondamentale nel determinare le proprietà cromatiche di tali composti (effetto auxocromo). Il sistema descritto costituisce infatti un cromoforo, ovvero un gruppo di atomi in grado di assorbire la luce visibile e di conferire un determinato colore ad una sostanza.

L'antrachinone si presenta come un solido cristallino di colore giallo e costituisce la base di molti coloranti. Le loro proprietà cromatiche possono essere intensificate sostituendo gli idrogeni dei gruppi metinici con funzioni auxocrome, ossia gruppi funzionali che favoriscono l'assorbimento della luce modificando la lunghezza d'onda di massimo assorbimento e aumentando l'assorbanza. Questi gruppi sono infatti dotati coppie di elettroni spaiati che possono estendere per risonanza il sistema coniugato. Nel caso degli antrachinoni la sostituzione avviene in particolare ad opera di gruppi idrossilici  $-OH$  e può riguardare otto diverse posizioni, inducendo a seconda dei casi una colorazione che va dal rosso al marrone scuro. Tra i coloranti antrachinonici più frequentemente utilizzati ci sono il carminio e la lacca di garanza.

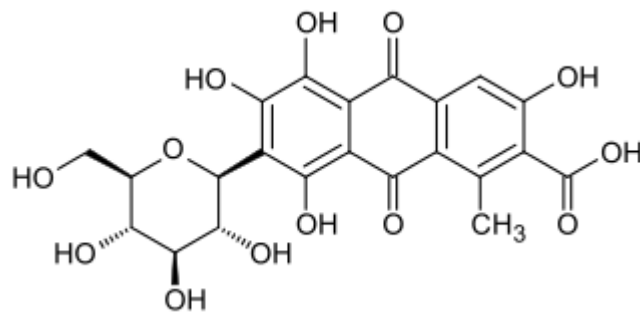
### 1.1.3 Carminio o Cocciniglia



Il carminio è un colorante rosso di origine animale ricavato dalle femmine dell'insetto *Coccus Cacti* (Cocciniglia). Usato sin dall'antichità per la tintura di tessuti precedentemente mordenzati, fece la sua comparsa in Messico presso gli Aztechi e venne successivamente importato in Europa nel corso del XVI secolo dai conquistatori spagnoli

(Schweppe et al., 1986). Al giorno d'oggi, a seguito della introduzione di coloranti sintetici maggiormente stabili alla luce, l'uso del carminio risulta meno frequente e limitato all'ambito della cosmetica o come colorante alimentare.

La molecola responsabile del colore della cocciniglia è l'acido carminico ( $C_{22}H_{20}O_{13}$ ), un antrachinone la cui struttura è caratterizzata da quattro gruppi idrossile, un metile, un carbossile e da una molecola di glucosio.



**Acido Carminico**

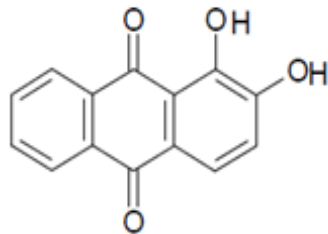
Per ottenere il colorante gli insetti essiccati venivano bolliti, dopodiché l'estratto acquoso veniva fatto precipitare su un substrato inorganico, tipicamente l'allume, con cui l'acido carminico interagisce formando dei complessi metallici. Per avere una tonalità più scarlatta si utilizzavano invece sali di stagno.

### 1.1.4 Garanza o Robbia

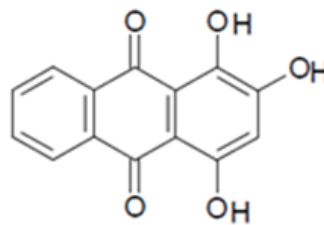


La garanza, o robbia, è uno dei coloranti rossi più antichi (le prime attestazioni risalgono infatti all'antico Egitto) e venne diffusamente utilizzata per molti secoli in tutta l'Europa sia per la tintura dei tessuti che in pittura in forma di lacca. Tale colorante veniva estratto dalle radici di piante erbacee appartenenti alla famiglia delle *Rubiaceae*, specialmente dalla specie *Rubia Tinctorum*.

I principali cromofori, entrambi appartenenti alla famiglia degli antrachinoni, sono l'alizarina ( $C_{14}H_8O_4$ ) e la purpurina ( $C_{15}H_9O_5$ ). La prima è caratterizzata da due gruppi idrossile in posizione 1 e 2, mentre la seconda ne presenta anche un terzo in posizione 4. In minor quantità sono inoltre presenti altri composti idrossiantrachinonici quali la quinizarina e la purpuroxantina, due isomeri dell'alizarina, o ancora la pseudopurpurina, la xanthopurpurina, la rubiadina e il morindone. (Schweppe et al., 1997).



**Alizarina**



**Purpurina**

Anche la garanza, una volta estratta, richiede un processo di mordenzatura per stabilire un'interazione fra le molecole organiche del colorante ed un substrato inorganico. Le radici venivano pertanto bollite in una soluzione di allume e poi filtrate prima di aggiungere carbonato di sodio e di portare nuovamente a bollore. Il liquido rosso così ottenuto era lasciato raffreddare per poi essere di nuovo filtrato in modo da raccogliere il colorante che,

una volta asciugato, si depositava in forma di polvere ed era pronto per essere mescolato al legante.

### 1.1.5 Le lacche

Le lacche sono pigmenti organici insolubili, ottenute aggiungendo a caldo un sale metallico (in genere allume di rocca,  $\text{AlK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) ad una soluzione di un colorante organico, precedentemente estratto dalla fonte naturale corrispondente con il metodo più appropriato. L'estrazione prevedeva che la fonte vegetale o animale di partenza venisse finemente macinata e lasciata macerare in acqua, aceto o soluzioni basiche. Si procedeva dunque con l'aggiunta del sale, spesso miscelato con una o più sostanze bianche o trasparenti quali carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) o biacca ( $\text{PbCO}_3 \cdot 2\text{Pb}(\text{OH})_2$ ) in modo da fornire un substrato inerte su cui il colorante potesse adsorbirsi e precipitare. Si otteneva così un nuovo pigmento, la cui sfumatura cromatica e le cui proprietà variavano considerevolmente a seconda delle condizioni di estrazione e del substrato inorganico scelto (Kirby et White, 1996). Dal punto di vista chimico la reazione di formazione delle lacche implica la formazione di un chelato: gruppi funzionali elettrondonatori adiacenti nelle molecole del colorante organico estratto (in genere gruppi ossidrilici e carbonilici) agiscono da leganti chelanti per gli ioni metallici provenienti dal sale, generando un complesso (Figura 1.2).

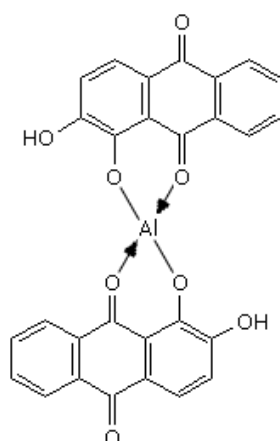


Figura 1.2: Formazione del complesso con l'alluminio nella lacca di alizarina.

La lacca rosso carminio, ottenuta facendo bollire gli insetti della cocciniglia, si caratterizzava per un colore vermiglio estremamente brillante ed intenso, molto apprezzato dagli artisti per le sue proprietà cromatiche, oltre che per la sua resistenza e stabilità nel tempo. Sin dalla sua introduzione in Europa a metà del Sedicesimo secolo, il rosso carminio venne utilizzato da alcuni illustri pittori, tra cui Rubens e Caravaggio, che ne fece un elemento fondamentale per creare i drammatici contrasti tra luce e ombra che caratterizzano la sua pittura. Non solo: le analisi hanno rivelato l'uso di questo tipo di rosso perfino nelle opere di Paul Gauguin, Auguste Renoir e Vincent van Gogh.

Quanto alla lacca di garanza, ricavata bollendo a lungo le radici della *Rubia tinctorum* e facendo precipitare sul substrato inorganico l'estratto ottenuto, assumeva una brillante tonalità rosso rubino. Per la sua natura trasparente questa lacca venne spesso impiegata da pittori per realizzare le velature, come si può osservare in numerose opere di Rembrandt, Rubens e soprattutto Vermeer.

### **1.1.6 Metodi analitici classici per l'analisi di cocciniglia e garanza**

Diversi metodi analitici convenzionali possono essere impiegati per l'identificazione del carminio e della garanza, sia in forma di coloranti che di lacche.

Tra le tecniche spettrofotometriche, la spettrofluorimetria permette di distinguere queste due sostanze in quanto in luce ultravioletta il carminio origina una fluorescenza di colore rosa, la garanza arancione. La spettrofotometria UV-Vis, nonostante presenti il vantaggio di non risentire dell'interferenza di composti incolore miscelati al colorante, risente invece del problema di bassa specificità: coloranti di tinta simile assorbono infatti a lunghezze d'onda analoghe, dando spettri difficili da distinguere.

Per quanto riguarda invece le spettroscopie vibrazionali, l'analisi all'infrarosso è utile per il riconoscimento di coloranti puri, ma nel caso di lacche, che contengono un'elevata proporzione di substrato inorganico, i segnali di quest'ultimo prevalgono e la qualità dello spettro non risulta sufficiente per l'identificazione. Sarebbero pertanto necessari trattamenti preliminari di idrolisi, concentrazione e purificazione per ottenere il colorante in forma pura. Quanto alla spettroscopia Raman, lo studio di sostanze organiche è limitato dall'intenso back-ground di fluorescenza.

Infine un riconoscimento pressoché univoco è possibile attraverso le tecniche cromatografiche (GC eventualmente abbinata a spettrometria di massa, HPLC), molto utili soprattutto nel caso della garanzia in quanto permettono la separazione ed il riconoscimento dei diversi cromofori. (Schweppe et Winter, 1997; Schweppe et Runge, 1986)

## 1.2 La spettroscopia Raman

### 1.2.1 La spettroscopia vibrazionale

La spettroscopia Raman, insieme alla spettroscopia infrarossa, rientra nella categoria delle tecniche spettroscopiche vibrazionali, di cui si illustrano brevemente i principi. Una molecola può essere considerata come un insieme di masse sferiche legate fra loro da molle che si comportano in accordo con la legge di Hooke:

$$F = -kdx$$

Tale equazione indica che la forza elastica  $F$  richiesta per comprimere od estendere una molla è direttamente proporzionale alla variazione di lunghezza  $dx$  e alla costante di forza  $k$ , dipendente dalla rigidità della molla.

In una molecola poliatomica possono verificarsi diversi moti vibrazionali, ognuno dei quali richiede una ben determinata energia quantizzata. Le vibrazioni possibili, in ordine di frequenza, sono le seguenti:

- Stretching ( $\nu$ ): variazione della lunghezza del legame fra due atomi. Lo stretching può essere simmetrico o asimmetrico, a seconda che i moti dei legami chimici avvengano nella stessa direzione o in direzioni opposte.

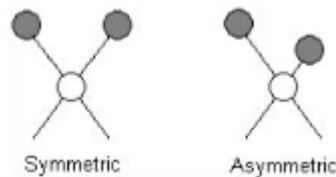


Figura 1.3: Rappresentazione schematica dei moti vibrazionali di stretching.

- Bending (scissoring) ( $\delta$ ): variazione planare simmetrica dell'angolo formato da tre atomi.
- Wagging ( $\gamma$ ): variazione simmetrica fuori dal piano dell'angolo tra il piano formato dai tre atomi coinvolti nel movimento e quello della molecola.
- Rocking ( $\rho$ ): variazione asimmetrica planare dell'angolo tra il piano formato dai tre atomi coinvolti nel movimento e quello della molecola.



- Twisting ( $\tau$ ): variazione asimmetrica fuori dal piano dell'angolo tra il piano formato dai tre atomi coinvolti nel movimento e quello della molecola.

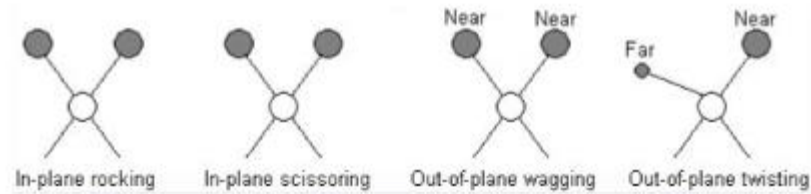


Figura 1.4: Rappresentazione schematica dei moti vibrazionali di rocking, scisso ring, wagging e twisting.

Ciascuna di queste vibrazioni genera nello spettro una banda che può essere studiata e classificata secondo questi parametri:

- Posizione: esprime l'energia della vibrazione in numeri d'onda ( $1/\lambda$ ) e dipende da due fattori: la forza del legame e la massa degli atomi coinvolti. In particolare la frequenza  $\nu$  della vibrazione è inversamente proporzionale al rapporto fra la costante di forza  $f$  e la massa ridotta ( $\mu = \frac{m_a \cdot m_b}{m_a + m_b}$ ) dei due atomi (a e b) coinvolti:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{\mu}}$$

Di conseguenza numeri d'onda alti corrispondono ad un legame forte, ovvero doppio o triplo, così come ad atomi 'leggeri' che generano una massa ridotta  $\mu$  piccola.

- Intensità: l'intensità relativa delle bande è correlata alla variazione di polarizzabilità  $\alpha$  associata a quella particolare vibrazione. Più tale cambiamento è grande, più la banda risulta intensa come nel caso di legami polari, la cui intensità è massima.
- Ampiezza: l'ampiezza delle bande dipende dalle interazioni intermolecolari e dai legami idrogeno, pertanto la polarità di una molecola può portare ad un consistente allargamento della banda generata da uno stesso gruppo funzionale.

Ciascuna banda è il risultato di una vibrazione molecolare o, in altri termini, della transizione tra due stati energetici vibrazionali quantizzati. È possibile calcolare il

numero di modi in cui una molecola può vibrare attraverso la formula  $3N-6$  (o  $3N-5$  nel caso di molecole lineari), dove  $N$  corrisponde al numero di atomi che compongono la molecola.

### 1.2.2 Principi di spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica spettroscopica vibrazionale basata sullo scattering anelastico di un fascio di luce monocromatica incidente. Questo fenomeno fu scoperto nel 1928 dal fisico indiano C.V. Raman: egli si accorse infatti che una piccola frazione della radiazione diffusa da certe molecole aveva un'energia diversa da quella della radiazione incidente, e che tale differenza di energia era legata alla struttura chimica delle molecole responsabili della diffusione. L'effetto Raman può dunque fornire un'impronta digitale unica per ciascuna molecola, il suo spettro Raman appunto.

Quando un campione è colpito da un fascio di luce monocromatica di frequenza  $\nu_0$ , la maggior parte dei fotoni incidenti viene assorbita, riflessa o trasmessa; solo una piccola frazione di essi interagisce con le molecole attraverso il proprio campo elettromagnetico portandole ad uno stato energetico eccitato virtuale  $h\nu_0$ . Quest'ultimo, corrispondente ad un livello intermedio fra lo stato fondamentale ed uno stato eccitato, è associato ad una condizione di forte instabilità, pertanto la molecola decade istantaneamente per tornare allo stato fondamentale attraverso uno dei processi di seguito descritti ed esemplificati nella figura 1.5:

- Diffusione Rayleigh: la molecola ritorna al suo stato fondamentale emettendo un fotone di energia pari a quella del fotone incidente. Questo fenomeno di diffusione elastica costituisce l'evento più frequente, ma non fornisce alcuna informazione riguardo alla molecola. La diffusione Rayleigh può essere espressa dalla seguente equazione, dove  $h\nu_0$  è l'energia del fotone incidente ed  $h\nu_1$  quella di quello diffuso:

$$h\nu_0 = h\nu_1$$

- Diffusione Raman Stokes e anti-Stokes: una piccola frazione dei fotoni incidenti (approssimativamente 1 su  $10^6$ ) è soggetta ad un fenomeno di diffusione anelastica, in cui la molecola non ritorna al suo stato vibrazionale fondamentale o non vi si trova in origine. Se la molecola decade ad uno stato vibrazionale eccitato emettendo un fotone di energia inferiore rispetto a quello incidente, si parla di diffusione

Raman Stokes, descritta dalla seguente equazione dove  $h\nu_i$  rappresenta la differenza di energia tra lo stato eccitato e lo stato fondamentale:

$$h\nu_1 = h\nu_0 - h\nu_i$$

Se invece la molecola si trova già in origine in uno stato elettronico eccitato e decade allo stato fondamentale emettendo un fotone di energia maggiore rispetto a quello incidente, si parla di diffusione Raman anti-Stokes, descritta dall'equazione:

$$h\nu_1 = h\nu_0 + h\nu_i$$

Questo fenomeno è tuttavia poco comune a temperatura ambiente, dal momento che in questa condizione di rado le molecole si trovano in uno stato energetico superiore rispetto a quello fondamentale.

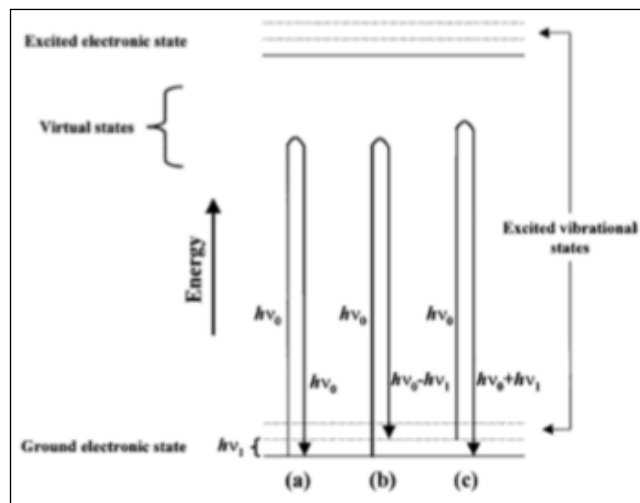


Figura 1.5: Diagramma dei livelli energetici che mostra l'emissione ed il decadimento di una molecola colpita da un fotone incidente di energia  $h\nu_0$ . (a) il fotone di energia  $h\nu_1$  ha la stessa energia del fotone incidente nel caso di diffusione Rayleigh, (b) un'energia inferiore della differenza fra stato eccitato e fondamentale ( $h\nu_i$ ) nella diffusione Stokes e (c) superiore della stessa energia  $h\nu_i$  in quella anti-Stokes.

In uno spettro Raman dovrebbero dunque comparire i segnali corrispondenti alle tre diffusioni, tuttavia le componenti Rayleigh e anti-Stokes non vengono mostrate in quanto non rilevanti a scopo analitico: la prima fornisce infatti solo informazioni sull'energia del fotone incidente, mentre la seconda risulta di troppo debole intensità per essere rivelata. Un tipico spettro presenta dunque soltanto i segnali dovuti alla diffusione Raman Stokes, riportando sull'asse delle ascisse l'energia dei fotoni diffusi fino al rivelatore in numero d'onda ( $1/\lambda$  in  $\text{cm}^{-1}$ ) e in ordinata la loro intensità relativa. Ciascuna banda corrisponde ad

una vibrazione permessa alla molecola in analisi ed è legata ai gruppi funzionali in essa presenti, pertanto è possibile sfruttarle a scopo diagnostico per identificare qualitativamente i composti presenti nel campione. L'aspetto quantitativo della spettroscopia Raman è invece scarsamente preso in considerazione, in quanto la disomogeneità della superficie analizzata può inficiare la riproducibilità della misura.

### 1.2.3 La spettroscopia SERS

La spettroscopia SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) è una tecnica basata sull'amplificazione dei segnali Raman di una molecola quand'essa si trova in prossimità o adsorbita su una superficie metallica rugosa (Figura 1.6). Questo effetto venne osservato per la prima volta nel 1974 da Fleischmann (Fleishman *et al.*, 1974) durante uno studio condotto mediante spettroscopia Raman su alcune reazioni elettrochimiche della piridina alla superficie di un elettrodo d'argento. Come scoprirono poco dopo Jeanmaire e Van Duye (Jeanmaire et Van Duye, 1977) e Albrecht e Creighton (Albrecht et Creighton, 1977) nel 1977, l'adsorbimento di una specie chimica su particolari superfici metalliche può portare ad un fattore di amplificazione dell'effetto Raman fino a  $10^8$ .

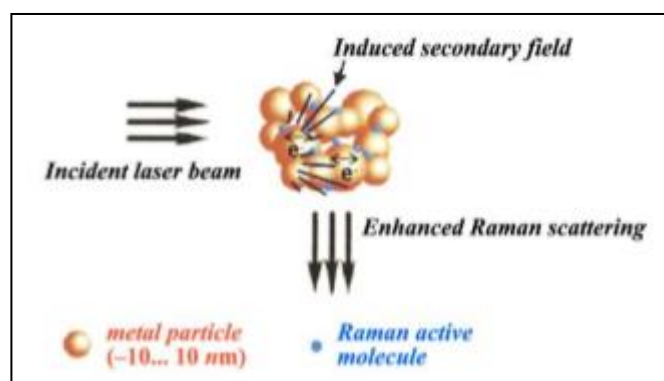


Figura 1.6: Illustrazione schematica del meccanismo SERS. (Chen et al., 2007)

Esiste una grande varietà di substrati SERS inclusi elettrodi modificati, superfici metalliche ordinate costituite da nanostrutture supportate su vetro o silicio, o ancora nanoparticelle in soluzione colloidale. Queste ultime, dopo i primi fortunati esperimenti eseguiti nel 1979 (P.

Taddei *et al.*, 2013) sono diventate in virtù del basso costo e della facilità di sintesi i substrati SERS più comunemente impiegati.

### 1.2.3.1 Proprietà ottiche dei metalli

L'amplificazione dell'effetto Raman è dovuta alle proprietà ottiche dei metalli, in genere oro ed argento. Ciascun materiale è caratterizzato da una funzione dielettrica  $\epsilon(\omega)$  e da un indice di rifrazione  $\eta(\omega)$ , entrambi dipendenti dalla frequenza della luce  $\omega$  e legati dalla seguente relazione:

$$\epsilon(\omega) = \sqrt{\eta(\omega)}$$

Per i materiali trasparenti questi parametri corrispondono a numeri positivi e reali, ma per gli altri presentano valori complessi che dipendono dalla frequenza e possono essere espressi attraverso una funzione reale ed una immaginaria. La parte reale della funzione dielettrica è grande e negativa, mentre quella immaginaria è piccola e positiva. Tenendo in considerazione soltanto la prima, la funzione dielettrica dei metalli può essere semplificata e descritta secondo il modello di Drude come funzione della frequenza  $\omega$  e della lunghezza d'onda  $\lambda$ :

$$\epsilon = \epsilon_{\infty} (1 - \omega_R^2/\omega^2) = \epsilon_{\infty} (1 - \omega_R^2/\omega^2)$$

dove  $\omega_R$  è la frequenza di plasma del metallo. Questo valore corrisponde alla frequenza a cui gli elettroni di conduzione oscillano ed è proporzionale alla radice quadrata del numero di elettroni liberi presenti. Tuttavia nel caso di metalli reali la parte immaginaria non è ininfluenza e determina l'assorbimento della luce: l'argento riflette quasi tutti i fotoni incidenti e la sua parte immaginaria tende a zero ( $\text{Im}[\epsilon(\lambda)] = 0$ ), mentre nel caso dell'oro si verifica un assorbimento a lunghezze d'onda inferiori a 600 nm, cui si deve il tipico colore di questo metallo.

Alla base della spettroscopia SERS si trova inoltre la risonanza indotta dalla geometria, resa possibile dalla struttura dei metalli. Infatti il fatto che i metalli abbiano una vasta gamma di  $\text{Re}[\epsilon(\lambda)]$  negative li rende ideali per soddisfare le condizioni di risonanza per svariati oggetti di geometria differente.

In genere i substrati SERS sono composti da particelle approssimativamente descrivibili come nanosfere dal diametro compreso fra 20 e 100 nm; la dimensione rappresenta un parametro fondamentale in quanto all'aumentare di essa si verifica uno spostamento a lunghezze d'onda maggiori (*red-shift*) del plasmone di risonanza. Nella seguente trattazione relativa alle proprietà ottiche dei metalli si considereranno pertanto solo nanoparticelle metalliche di forma sferica.

Quando un campo elettrico esterno interagisce con una nanoparticella metallica, si genera un dipolo indotto  $\mu$ , dipendente dalla funzione dielettrica del mezzo circostante, in genere l'aria ( $\epsilon_M = 1$ ), e da quella del metallo  $\epsilon(\lambda)$ , a sua volta correlata alla lunghezza d'onda:

$$\mu \propto \frac{\epsilon(\lambda) - \epsilon_M}{\epsilon_\lambda + 2\epsilon_M}$$

Quando  $\epsilon(\lambda) = -2\epsilon_M$ , il denominatore vale zero e il dipolo indotto tende ad infinito. Nello specifico la parte reale della funzione dielettrica soddisfa la condizione ( $\text{Re}[\epsilon(\lambda)] = -2\epsilon_M$ ), limitata soltanto dalla componente immaginaria, la cui influenza, soprattutto per l'argento, può essere considerata trascurabile. Di conseguenza il sistema dà luogo alla cosiddetta risonanza plasmonica di superficie localizzata (LSPR) della sfera. Pertanto, quando la lunghezza d'onda del campo incidente soddisfa le condizioni di contorno per la risonanza ( $\lambda \sim \lambda_R$ ), la superficie della sfera sarà soggetta ad un forte incremento del campo locale. Quest'ultimo può essere calcolato attraverso il fattore di amplificazione locale del campo (LFIEF), che corrisponde al rapporto fra il valore normalizzato dell'intensità del campo locale in posizione  $r$ , dipendente dalla lunghezza d'onda incidente  $\lambda$  e proporzionale al quadrato dell'energia del campo elettrico  $E(r, \lambda)$ , e l'intensità del campo incidente  $E_0(r, \lambda)$  nella stessa posizione:

$$LFIEF(r, \lambda) = \frac{|E(r, \lambda)|^2}{|E_0(r, \lambda)|^2}$$

L'LFIEF è una grandezza adimensionale che esprime la variazione di intensità locale del campo causata dalla presenza di oggetti che perturbano il campo elettrico della luce. Nel caso di una sfera risulta massima alle due estremità dell'asse passante attraverso il centro, dove il campo esterno e il dipolo indotto si sommano (Figura 1.7). Se una molecola si trova

in queste posizioni, sarà pertanto a sua volta soggetta ad un consistente incremento del campo, dando luogo all'effetto SERS.

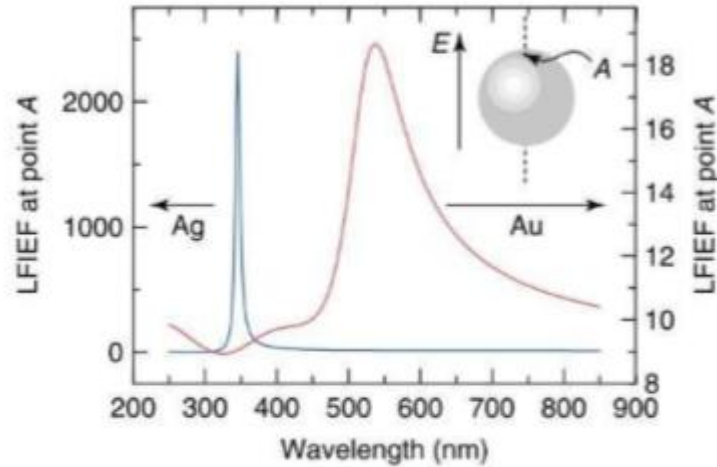


Figura 1.7: Grafico che rappresenta l'LFIEF nel punto A di una sfera d'Ag o Au. Quando le condizioni di risonanza sono soddisfatte, l'amplificazione del campo locale è massima. Per l'argento la  $\lambda$  di risonanza è intorno a 350 nm e per l'oro 550 nm.

### 1.2.3.2 Amplificazione dell'effetto Raman e spegnimento della fluorescenza

Un'interessante e vantaggiosa caratteristica del SERS risiede nel fatto che, oltre ad amplificare l'effetto Raman, la presenza di nanoparticelle metalliche porta ad un'attenuazione della fluorescenza. I meccanismi alla base di questi due fenomeni sono molto diversi in relazione alla loro natura.

La diffusione Raman-Stokes è un processo istantaneo che non implica l'assorbimento del fotone incidente: quest'ultimo eccita la molecola ad uno stato virtuale e durante il decadimento è riemesso con un'energia inferiore, lasciando la molecola in uno stato vibrazionale diverso da quello fondamentale. La fluorescenza è invece un fenomeno graduale, basato sull'assorbimento di un fotone che porta la molecola ad un nuovo stato elettronico ( $S_1$ ). In seguito, prima di riemettere il fotone per passare nuovamente allo stato fondamentale  $S_0$ , quest'ultima va incontro ad una serie di passaggi attraverso i sottolivelli vibrazionali di  $S_1$ . La differenza principale fra questi due fenomeni sta dunque nel fatto che, mentre per la diffusione Raman l'assorbimento e la remissione del fotone sono processi pressoché istantanei, questo non accade nella fluorescenza. Di conseguenza entrambi gli eventi sono positivamente influenzati dall'assorbimento di un fotone incidente, ma nel

processo di riemissione soltanto la diffusione Raman è beneficiata da un incremento di intensità proporzionale alla quarta potenza del campo elettrico incidente ( $|E^4|$ ). Al contrario nella fluorescenza la riemissione è svincolata dall'assorbimento e per questo motivo l'unico possibile effetto dell'ambiente su di essa è di modificare il contributo radiativo e non radiativo del decadimento, la cosiddetta efficienza radiativa  $\eta$ . In genere la presenza di una superficie metallica inibisce il decadimento radiativo assorbendo i fotoni emessi: in questo modo la combinazione fra l'assorbimento intensificato e la bassa efficienza  $\eta$  ( $0 \leq \eta \leq 1$ ) causa una forte diminuzione della fluorescenza per una molecola che si trova in prossimità del substrato metallico.

### 1.2.3.3 Meccanismo di intensificazione dell'effetto SERS

L'effetto SERS e l'esatto meccanismo che sta alla base di esso sono ancora oggetto di dibattito in letteratura. Ad oggi comunque se ne ritengono responsabili due diversi effetti, elettromagnetico e chimico.

In base alla teoria elettromagnetica l'intensificazione del segnale Raman per molecole su particolari superfici è dovuta ad un incremento del campo elettrico prodotta dalla superficie stessa; questa spiegazione può essere applicata anche in quei casi in cui la specie è solo fisioadsorbita alla superficie, senza interagire chimicamente con essa. Dall'altro lato, la teoria chimica propone un trasferimento di carica fra gli orbitali molecolari dell'analita e la banda di conduzione del metallo nobile che costituisce il substrato stesso; questa teoria si applica pertanto solo per le specie chimiche che sono legate alla superficie mediante un legame chimico. (Guerrini et al., 2007). I due fenomeni non apportano lo stesso contributo all'effetto SERS: l'elettromagnetico contribuisce infatti per un ordine di grandezza di  $10^{10}$ , mentre il chimico di  $10^2$ .

Per spiegare il funzionamento di entrambi, bisogna considerare le origini dell'effetto Raman. Quando il campo elettrico,  $E$ , di un fotone incidente interagisce con una molecola di polarizzabilità  $\alpha$ , induce un momento dipolare magnetico secondo l'espressione:

$$\mu = \alpha E \quad \left[ \mu = \frac{cm^2}{v} \cdot \frac{v}{m} = Cm \right]$$



Dal momento che la polarizzabilità dipende dalle coordinate dei nuclei, le vibrazioni molecolari inducono una variazione in essa.

Per prima cosa bisogna considerare che l'intensità dell'effetto Raman, corrispondente al numero di fotoni emessi, è proporzionale al quadrato del campo elettrico applicato moltiplicato per il quadrato della polarizzabilità:

$$I_{\text{Raman}} \propto E^2 \alpha^2$$

Nell'effetto elettromagnetico, l'intensificazione della diffusione Raman è dovuta al campo elettrico in prossimità della superficie del metallo, mentre in quello chimico si assiste ad una modificazione della polarizzabilità delle molecole adsorbite.

Considerando l'intensificazione Raman indotta dall'effetto elettromagnetico (Figura 1.8), il campo elettrico che influenza le molecole assorbite su nanoparticelle metalliche, in posizione  $r$ , è dato dalla somma fra quello della radiazione laser ( $E_0$ ) e quello generato dal metallo stesso ( $E_S$ ). I fotoni di queste due componenti hanno la stessa frequenza  $\omega_0$  e quand'essa coincide col plasmone di risonanza superficiale del metallo il campo diffuso da quest'ultimo risulta amplificato di un fattore  $g$ . E' dunque possibile approssimare il campo elettrico totale che interessa la molecola con quello prodotto dalla superficie metallica. Questi concetti possono essere sintetizzati nelle seguenti equazioni:

$$E_{\text{TOT}}(r, \omega_0) = E_0(r, \omega_0) + E_S(r, \omega_0)$$

$$E_{\text{TOT}}(r, \omega_0) \approx E_S(r, \omega_0) = g E_0(r, \omega_0)$$

Il suddetto campo elettrico indurrà nella molecola un momento dipolare magnetico dipendente dalla sua polarizzabilità secondo l'equazione:

$$\mu(r, \omega_0) = \alpha_R E_{\text{TOT}}(r, \omega_0)$$

Di conseguenza, la radiazione Raman di frequenza  $\omega_R$  avrà un campo elettrico con un'energia  $E_R$  proporzionale ad  $\alpha_R \cdot E_S$ . L'energia dei fotoni Raman verrà dunque intensificata dalle nanoparticelle di un fattore  $g$  allo stesso modo di quella dei fotoni della radiazione laser, cosicché il campo elettrico totale diffuso sarà dato da:

$$E_{\text{TOT}}(r, \omega_0) = E_R(r, \omega_0) + E_{RS}(r, \omega_0)$$

$$E_{\text{TOT}}(r, \omega_0) \approx E_{RS}(r, \omega_0) = g E_R(r, \omega_0)$$

In questo modo l'energia risultante del campo elettrico diffuso o, in altri termini, dell'effetto Raman amplificato corrisponde a:

$$E_{\text{SERS}} \approx E_{\text{RS}}(r, \omega_0) \propto g E_{\text{R}} \propto g \alpha_{\text{R}} E_{\text{S}} \propto g g \alpha_{\text{R}} E_{\text{S}} \propto g g \alpha_{\text{R}} E_0$$

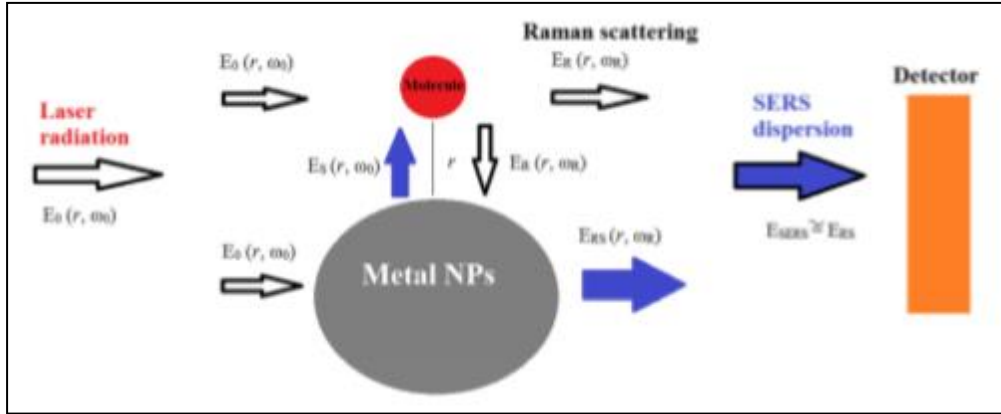


Figura 1.8: Rappresentazione schematica dell'effetto SERS elettromagnetico. Il campo elettrico che influenza una molecola in prossimità di una NPs, in posizione  $r$ , corrisponde alla somma fra quello del laser ( $E_0$ ) e di quello diffuso dal metallo stesso ( $E_S$ ). La radiazione Raman diffusa totale registrata dal detector è la somma di quella emessa dalla molecola ( $E_R$ ) e quella amplificata dalle NPs ( $E_{\text{RS}}$ ).

L'intensità dei fotoni diffusi per effetto SERS risulterà proporzionale all'intensità del campo elettrico incidente moltiplicato per il quadrato del fattore di amplificazione e della polarizzabilità della molecola:

$$I_{\text{SERS}} \approx (g \cdot g)^2 \alpha_{\text{R}}^2 E_0$$

Generalmente la differenza fra la frequenza dei fotoni incidenti e di quelli Raman è trascurabile così da poter approssimare il fattore di amplificazione della radiazione incidente e di quella diffusa. In questo modo l'amplificazione della radiazione incidente risulta moltiplicato per la quarta potenza del fattore di amplificazione,  $g^4$ .

È inoltre molto importante definire il fattore di intensificazione  $G$  per comprendere la relazione fra l'intensità Raman e SERS del campo elettrico dei fotoni diffusi:

$$G = \frac{I_{\text{SERS}}}{I_{\text{Raman}}} = \frac{\alpha_{\text{R}}}{\alpha_{\text{R0}}} \cdot g^4$$

Dove  $I_{\text{Raman}}$  è l'intensità del campo elettrico diffuso senza il metallo e  $\alpha_{\text{RO}}$  la polarizzabilità della molecola in assenza del substrato SERS.

Il secondo fenomeno alla base dell'effetto SERS è quello chimico (Figura 1.9). A differenza dell'elettromagnetico per cui è sufficiente che le molecole di analita si trovino in prossimità del substrato, l'effetto chimico richiede un'interazione diretta fra analita e metallo, ovvero la formazione di un legame chimico. In dettaglio: quando l'interazione è debole si parla di *fisisorbimento* e si verifica una modificazione della polarizzabilità delle molecole, se invece l'interazione è forte abbastanza da permettere un *chemisorbimento*, queste ultime formano un complesso col metallo in cui possono verificarsi nuove transizioni elettroniche che portano al raggiungimento di differenti livelli energetici dell'adsorbato. Tali transizioni, indotte dalla radiazione esterna, consistono in processi di trasferimento di carica in cui gli elettroni appartenenti ad orbitali HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) dell'adsorbato passano ad orbitali LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) dell'adsorbato stesso o al livello di Fermi del metallo. Quest'ultima transizione è la più comune, favorita da una più forte interazione molecola-NPs che garantisce un maggior grado di mescolamento fra gli orbitali molecolari. Il trasferimento di carica avviene di preferenza per molecole ricche di elettroni  $\pi$  inclini ad essere ceduti e pertanto coinvolti nel processo.

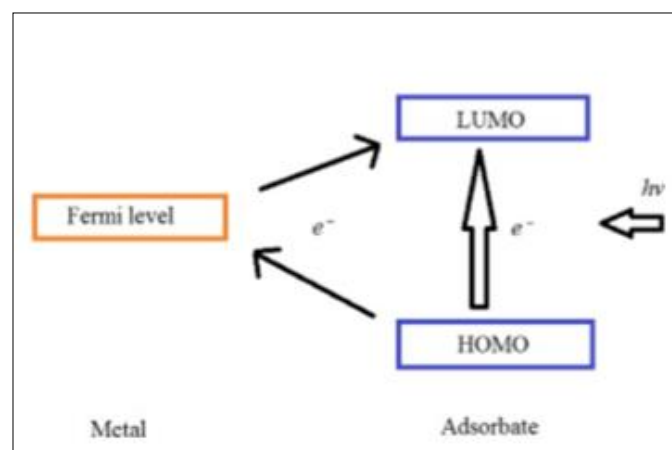


Figura 1.9: Meccanismo chimico dell'effetto SERS: quando la molecola è chemisorbita sul metallo gli orbitali tendono a sovrapporsi; in questo modo un fotone incidente di energia  $h\nu$  può promuovere l'eccitazione di un elettrone da un orbitale HOMO della molecola ad uno LUMO con un passaggio diretto o passando attraverso l'intermedio livello di Fermi del metallo.

#### 1.2.3.4 La spettroscopia SERS nell'analisi dei coloranti organici

L'applicazione della spettroscopia SERS nell'ambito della diagnostica dei beni culturali è relativamente recente. Sebbene infatti Guineau e Guihard adottarono tale tecnica per identificare coloranti di interesse artistico ed archeologico già nel 1987 (B.Guineau et V.Guihard, 1987), a causa delle difficoltà nell'ottenere risultati consistenti e riproducibili è soprattutto negli ultimi decenni che il SERS è stato sfruttato per lo studio dei coloranti organici anticamente impiegati nella tintura dei tessuti o in pittura sotto forma di lacche. (Brosseau et Casadio, 2011; Pozzi et al., 2012; Casadio et al., 2010; Leona et al., 2006).

Molteplici caratteristiche rendono la spettroscopia SERS una tecnica ideale per l'identificazione dei coloranti organici: per prima cosa la maggior parte dei cromofori è dotata di estesi sistemi di elettroni  $\pi$  o di atomi con coppie di elettroni spaiati, fattori che favoriscono l'adsorbimento alle nanoparticelle; in secondo luogo, molte delle molecole dei coloranti sono fluorescenti e pertanto, mentre i loro spettri Raman tradizionali risultano oscurati da un intenso background, il SERS, spegnendo la fluorescenza, permette l'identificazione univoca di questi composti; infine i coloranti sono in genere presenti in microscopica quantità e dunque la loro analisi richiede una tecnica ultrasensibile (Leona et al., 2006).

Ad oggi la maggior parte delle ricerche condotte ha riguardato materiali di riferimento: gli antrachinoni alizarina e purpurina sono stati i principali oggetti di studio (Whitney et al., 2006 e 2007; Canamares et Leona, 2007; Shadi et al., 2004; Canamares et al., 2004; Chen et al., 2006) in virtù della facilità con cui si adsorbono alle nanoparticelle metalliche e dell'intensità dei loro segnali SERS, ma è stato investigato anche il comportamento di alcune molecole pure appartenenti alle famiglie dei flavonoidi e degli indigoidi (Shadi et al., 2003; Withnall et al., 2005). Tutto ciò ha portato alla recente pubblicazione di alcune banche dati (Bruni et al., 2011; Leona et al., 2006) contenenti un gran numero di spettri di riferimento sia dei cromofori sia dei coloranti puri, così come estratti dalle risorse vegetali o animali corrispondenti. Nel caso di campioni reali la spettroscopia SERS rappresenta tuttavia sotto alcuni aspetti ancora una sfida: nelle opere d'arte e nei reperti archeologici i coloranti sono infatti inseriti in una matrice complessa costituita dal legante o da sali metallici con cui si legano a formare complessi insolubili; questa condizione rende il loro adsorbimento sulle nanoparticelle metalliche più difficile, limitando la possibilità di acquisire spettri Raman ben definiti e risolti. Per ovviare a questa difficoltà, le fibre tessili e i campioni provenienti da

dipinti venivano inizialmente sottoposti a trattamenti preliminari di idrolisi o estrazione, così da ottenere il colorante nella sua forma libera. Al giorno d'oggi tuttavia sono stati testati con successo nuovi approcci che permettono di evitare queste procedure iniziali e la conseguente distruzione del campione (Pozzi et al., 2012; Leona et al., 2006; Leona et al., 2006; Brosseau et al., 2009; Jurasekova et al., 2010), nonché sono state messe a punto strategie innovative volte a trasformare il SERS da tecnica micro-distruttiva a non-distruttiva. Tra queste figurano l'impiego di idrogel per estrarre microscopiche tracce di colorante (Leona et al., 2011; Lofrumento et al., 2013; Platania et al., 2004; Doherty et al., 2011), l'ablazione laser seguita dall'analisi SERS delle sostanze ablate e lo sviluppo di *nanoprob* basati su fibre ottiche (Stokes et al., 2004).

In conclusione, il SERS rappresenta per l'analisi dei coloranti d'interesse artistico un'importante risorsa, le cui potenzialità possono essere ulteriormente sviluppate rendendolo una tecnica sempre più adatta per l'applicazione nel campo dei beni culturali.

## 1.3 Nanomateriali per applicazioni SERS

### 1.3.1 *Template Deposition* di metalli quasi monodimensionali

La *template synthesis* è una procedura relativamente semplice che può essere utilizzata per ottenere sofisticati nanomateriali pressoché in tutti i laboratori. Il metodo, basato sull'idea che i pori di un materiale possano essere utilizzati come stampo per orientare la crescita di nuove strutture metalliche, venne storicamente introdotto da Possin (G.E. Possin, 1970), sviluppato da Williams e Giordano (W.D.Williams et N.Giordano, 1984) ed infine ulteriormente perfezionato presso i laboratori di Martin (R. M. Penner et C. R. Martin, 1987). A questo scopo vengono impiegate membrane nanoporose in allumina o in policarbonato, comunemente utilizzate come membrane da filtrazione. Le prime, preparate per anodizzazione controllata dell'alluminio (J.W.Diggle et al., 1969), sono caratterizzate da pori molto densi ed ordinati, disposti parallelamente gli uni rispetto agli altri e dalla caratteristica forma esagonale. Le seconde, ottenute mediante il procedimento di *track-etching*, che prevede l'irraggiamento di un sottile film polimerico con frammenti di fissione nucleare o raggi ionici seguito da *etching* in soluzione alcalina, presentano invece una porosità più rada ed irregolare, con pori disposti ed orientati casualmente. Le membrane in policarbonato offrono tuttavia il vantaggio di una maggiore flessibilità rispetto a quelle in allumina, rigide ed estremamente fragili.

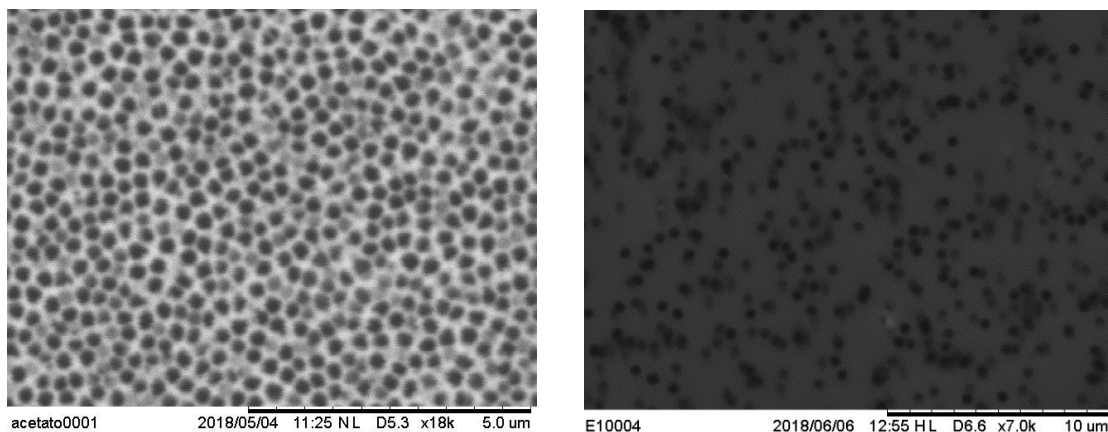


Figura 1.10: Immagini al SEM di membrane nanoporose in a) allumina e b) policarbonato.

A seguire si presenta una tabella riassuntiva delle caratteristiche delle membrane commerciali in policarbonato (SPI Pore) e in allumina (Anodisc47) utilizzate per la deposizione di nanofili metallici nel presente lavoro di tesi.

MATERIALE	DIAMETRO PORI	DENSITA' PORI	SPESSORE	AREA ESPOSTA/ cm <sup>2</sup>
Policarbonato	400 nm	1 x 10 <sup>8</sup> pori/cm <sup>2</sup>	10 μm	6,28 x 10 <sup>-2</sup> cm <sup>2</sup>
Policarbonato	200 nm	1 x 10 <sup>8</sup> pori/cm <sup>2</sup>	10 μm	3,14 x 10 <sup>-2</sup> cm <sup>2</sup>
Allumina (Anodisc47)	200 nm	1 x 10 <sup>9</sup> pori/cm <sup>2</sup>	60 μm	3,14 x 10 <sup>-1</sup> cm <sup>2</sup>

Tabella 1.1: Caratteristiche delle membrane commerciali in allumina e policarbonato impiegate.

### 1.3.1.1 Deposizione elettrochimica

La deposizione elettrochimica di metalli entro i pori di una membrana nanoporosa richiede che un lato di essa sia in diretto contatto con una superficie metallica; a tale scopo si può effettuare, sotto vuoto e mediante un plasma di Argon, lo *sputtering* di un sottile film metallico su una delle due facce della membrana o semplicemente garantire una buona adesione alla superficie dell'elettrodo. Diversi tentativi effettuati hanno tuttavia messo in luce come il primo metodo risulti di maggiore efficacia (Stortini et al., 2015). Il metallo con cui si forma lo strato conduttivo può inoltre essere lo stesso da depositare o uno diverso.

Per effettuare la deposizione, la membrana così metallizzata è inserita in una cella elettrochimica dove svolge la funzione di catodo, mentre un contro elettrodo funge da anodo (P.Ugo et L.M. Moretto, 2006). Il prodotto finale sono nanoparticelle solide e non strutture cave, per esempio nanotubi o nanocapsule, in quanto questo processo elettrochimico consiste nel riempimento dei pori a partire dalla base metallica per arrivare progressivamente alla sommità (figura 1.11).

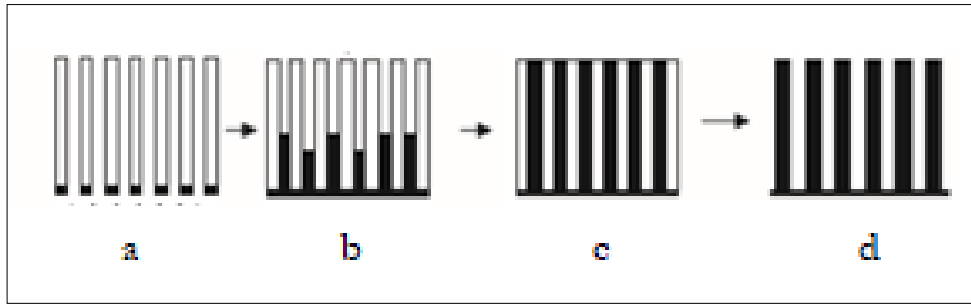


Figura 1.11 Sequenza di crescita dei NWs: a) base metallica sputterata per favorire la successiva deposizione; b) elettrodeposizione del metallo; c) crescita dei NWs; d) etching del template.

In una deposizione chimica di tipo potenziostatico viene applicato un potenziale riducente costante nel tempo. Studiando la curva crono-amperometrica ( $I_{\text{corrente}}$  vs  $t$ ) registrata durante l'intero processo, è possibile distinguere tre diverse regioni che caratterizzano l'evoluzione nel tempo della corrente (T.M. Whitney et al., 1993). Come illustrato in figura 1.12, nella prima parte della curva (I) i nanowires crescono entro i pori del template, nella seconda (II) risultano completamente riempiti ed infine nella terza (III) il metallo comincia a fuoriuscire e a ricoprire la superficie della membrana.

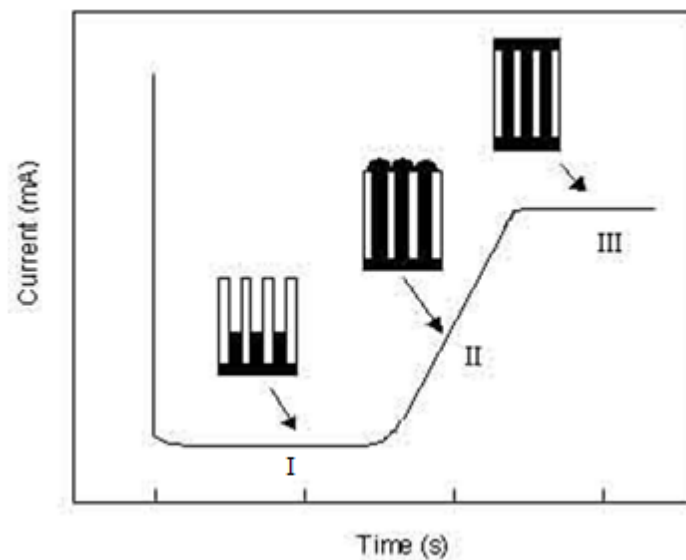


Figura 1.12: Dipendenza della corrente dal tempo di deposizione in condizioni potenziostatiche: nella fase I i nanofili si sviluppano entro i pori, nella fase II i pori risultano completamente riempiti e nella III la superficie della membrana risulta ricoperta.



Per ottenere dei nanofili è necessario arrestare la deposizione al termine della prima fase, altrimenti col procedere della seconda si assiste alla formazione di caratteristiche strutture a forma di “fungo” dovute alla crescita del metallo una volta riempiti completamente i pori del *template* (Fig. 1.13).

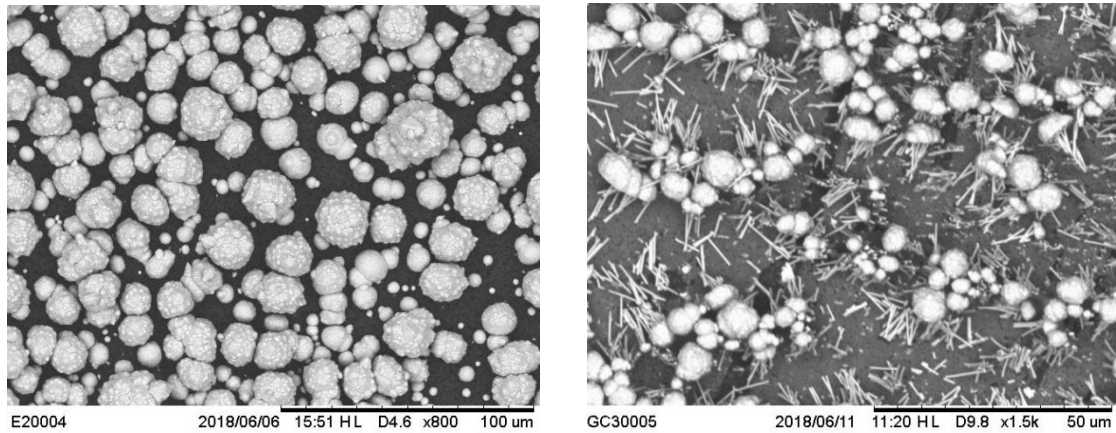


Figura 1.13: Immagini SEM di strutture fungiformi a) prima e b) dopo l'etching della membrana in policarbonato.

### 1.3.1.2 Deposizione *electroless*

La deposizione *electroless* prevede l'impiego di un agente chimico riducente per far precipitare il metallo da una soluzione su una superficie (M. Paunovic, M. Schlesinger, 1998). Requisito chiave per questo processo è fare in modo che la cinetica del trasferimento omogeneo di elettroni dall'agente riducente agli ioni del metallo in soluzione sia lenta; solo successivamente un catalizzatore può essere applicato alla superficie del *template* così da accelerare il processo e far sì che essa venga rapidamente ricoperta dal metallo desiderato. È inoltre possibile controllare lo spessore del film metallico variando il tempo di deposizione.

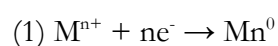
A differenza che per la deposizione elettrochimica, la crescita dello strato metallico ha origine non dalla base, bensì dalle pareti dei pori da cui procede poi verso l'interno. Per questo motivo, arrestando la deposizione dopo un tempo sufficientemente breve, è possibile ottenere nanostrutture cave, quali nanotubi (Wirtz et Martin, 2003) o nanocapsule. Per riempire invece completamente i pori e formare i nanofili, il processo dev'essere protratto per circa 24 ore. Al termine della deposizione è infine possibile separare le nanostrutture sintetizzate dal *template* o mantenerle al suo interno.

La deposizione *electroless* è stata impiegata con successo per ottenere nanostrutture di diversi metalli (oro, argento, cobalto, rame, ferro e nichel sono solo alcuni esempi) e di diversa geometria, sfruttando come template membrane in materiali differenti.

### 1.3.2 Formazione di nanoparticelle metalliche di diversa geometria

Le nanoparticelle metalliche impiegate come substrato SERS possono essere ottenute attraverso diversi procedimenti di sintesi; in particolare è possibile distinguere fra quelli via chemio-riduzione in soluzione acquosa e quelli via foto-riduzione.

Quanto alla chemio-riduzione, esistono numerosi metodi che possono essere impiegati per produrre nanoparticelle in soluzione acquosa, ognuno dei quali permette di originare colloidali con caratteristiche diverse fra loro. Ogni reazione di sintesi implica un sale metallico ed un agente riducente, il quale svolge la duplice funzione di promuovere la reazione redox e di stabilizzare la nanoparticella formando il doppio strato elettrico attorno ad essa. Proprio la possibilità di utilizzare diversi sali metallici e agenti riducenti, oltre alla variazione delle loro concentrazioni e degli altri parametri sperimentali, ha permesso lo sviluppo di molteplici metodi di sintesi, ognuno dei quali ha reso possibile l'ottenimento di particelle con dimensioni e stabilità differenti. La reazione alla base del processo può essere riassunta come:



A seguito dell'ossidazione-riduzione, gli atomi del metallo ridotto tendono a raggrupparsi formando dei cluster che, aggregandosi a loro volta, danno origine alle nanoparticelle.

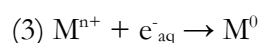
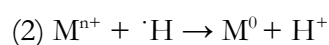
La chemio-riduzione permette per lo più di formare nanostrutture di forma sferica, sebbene impiegando particolari tecniche sia possibile ottenere anche altre morfologie, come nel caso delle nanostelle.

Di seguito si riassume brevemente lo stato dell'arte dei substrati metallici utilizzati per le analisi SERS di campioni d'interesse culturale. Il colloidale più frequentemente impiegato in

virtù della sua efficacia è costituito da nanoparticelle d'argento o d'oro ridotte con trisodio citrato ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ), sintetizzate secondo la procedura riportata da Lee e Meisel (Lee P.C. and Meisel D.J., 1982). Questo substrato SERS è stato impiegato per analizzare coloranti naturali e sintetici in soluzione (Leona M. et al., 2006; Canameres et al., 2008; Chang J. Et al., 2009), nonché polveri mescolate a diversi leganti eseguendo o meno trattamenti preliminari di idrolisi o estrazione (Brosseau C. et al., 2009; Brosseau C. et al., 2011). Sono inoltre state condotte analisi su fibre tessili pretrattate (Leona M. et al., 2006; Cañameres M.V. et al., 2009) o su tessuti tali e quali (Brosseau C. et al., 2009; Wustholz K.L. et al., 2009), oltre che su campioni reali pluristratificati provenienti da opere d'arte (Daher C. et al., 2013).

I colloidi d'argento possono in aggiunta essere sintetizzati sfruttando altri agenti riducenti, come il sodio boro idrato ( $NaBH_4$ ) (Van Elslande et al., 2007) e l'idrossilammina cloridrato ( $NH_2OH \cdot HCl$ ) (Cañameres M.V. 2005; Cañameres M.V. et al., 2008).

Per quanto riguarda invece la foto-riduzione, le nanoparticelle vengono prodotte direttamente sul campione in analisi: una goccia di soluzione contenente il sale metallico viene depositata sulla superficie ed investita col fascio laser del Raman per un tempo dipendente dalla lunghezza d'onda e dalla potenza della luce, così che l'irraggiamento possa indurre la riduzione degli ioni  $Ag^+$  ad argento metallico. La radiazione incidente causa infatti l'ossidazione delle molecole d'acqua che a loro volta vanno a ridurre gli ioni del metallo. In particolare il raggio laser produce due specie riducenti altamente reattive, idrogeno atomico  $\cdot H$  ed elettroni acquosi  $e^-_{aq}$ , ed un ossidante, il radicale  $\cdot OH$ . Le reazioni che avvengono sono:



Gli atomi del metallo ridotti tendono dunque a raggrupparsi in cluster, dando luogo alla conseguente formazione di AgNPs (Cañameres M.V. 2005; Jurasekova Z., 2011).

Le nanoparticelle foto-ridotte sono state impiegate direttamente sulla fibra senza necessità di alcun trattamento preliminare d'estrazione o idrolisi per l'analisi di flavonoidi (Jurasekova Z., 2009) e lacche antrachinoniche (Jurasekova Z., 2010).

### 1.3.3 Aggregazione di nanoparticelle

Al fine di aumentare l'efficacia di un substrato SERS, è necessario indurre l'aggregazione delle nanoparticelle stesse. Tale processo può talvolta avvenire spontaneamente quando le NPs entrano in contatto con l'analita, ma nella maggior parte dei casi risulta necessario aggiungere un aggregante, in genere nitrato di potassio o cloruro di sodio, che provochi la formazione di cluster di nanoparticelle. Gli anioni  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{Cl}^-$  in soluzione reagiscono infatti con le cariche positive presenti sulla superficie delle nanoparticelle, formando intorno ad esse un doppio strato ionico: lo strato di diffusione e lo strato di Stern, dove hanno luogo le interazioni elettriche più forti (figura 1.14). Questo processo porta ad una riduzione del potenziale  $\zeta$ , ossia il potenziale che si genera in seguito alla formazione del doppio strato elettrico. Un valore elevato di esso conferisce maggiore stabilità ai sistemi colloidali, in quanto si originano repulsioni elettrostatiche che impediscono l'aggregazione delle particelle disperse; abbassando il potenziale  $\zeta$ , le forze attrattive prevalgono invece sulle repulsioni favorendo così l'avvicinamento fra le nanoparticelle.

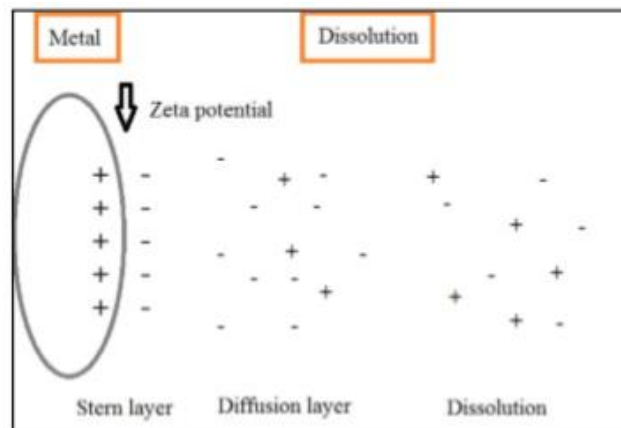


Figura 1.14: Rappresentazione della distribuzione delle cariche fra la superficie del metallo e la zona di dissoluzione: i cluster di NPs presentano sulla superficie cariche residue positive che attraggono ioni negativi, formando lo strato di Stern. Tale attrazione decresce nello strato di diffusione fino a scomparire gradatamente.

Nel caso delle nano particelle d'argento a forma di stella, grazie al loro elevato potere di *enhancement*, non risulta necessario il processo di aggregazione, ma è sufficiente concentrarle.

### 1.3.4 Formazione di nanostrutture gerarchiche

Al fine di verificare se l'impiego di nanostrutture gerarchiche di nanoparticelle porti ad ottenere un'amplificazione dell'effetto Raman ancora maggiore, le nanostelle d'argento sono state depositate su nanofili di oro e di rame. Per ottenere questi sistemi gerarchici i campioni sono stati funzionalizzati con cisteamina, molecola organica che grazie ai suoi gruppi funzionali funge da ponte permettendo l'assemblaggio dei diversi nanomateriali. (Dyne et al., 2010; Ugo et Silvestrini, 2013)

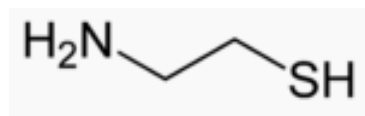


Figura 1.15: Struttura chimica della cisteamina.

I gruppi solfidrilici -SH terminali si legano infatti preferenzialmente alla superficie di oro, con cui hanno una grande affinità, lasciando i gruppi amminici -NH<sub>2</sub> disponibili per la successiva immobilizzazione delle nanoparticelle d'argento. La formazione di strutture tridimensionali ha pertanto luogo a seguito dell'instaurarsi di deboli legami covalenti tra le funzionalità amminiche libere e la superficie (Leff et al., 2007).

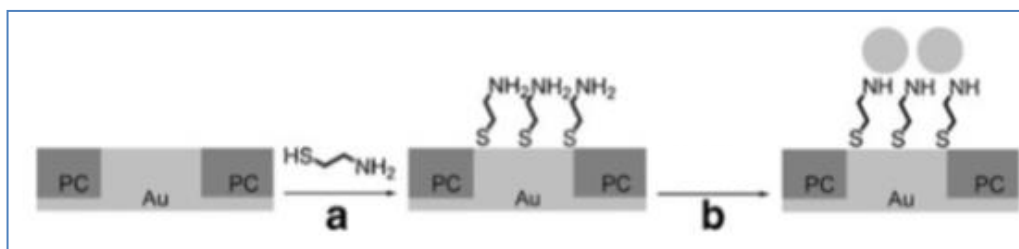


Figura 1.16: a) Funzionalizzazione della membrana con cisteamina; b) immobilizzazione delle AgNSs.

## 2. PARTE SPERIMENTALE

### 2.1 Materiali: reagenti chimici e lacche impiegate

Tutti i reagenti chimici impiegati erano di grado RP o superiore, ad eccezione dell'idrossilammina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), utilizzata in soluzione 50 % m/V in acqua.

Quanto alle lacche coloranti si trattava invece di:

**Carminio estratto:** lacca rossa acquistata da Zecchi (0116E) e fornita da Kremer Pigmente. Il principale cromoforo è l'acido carminico (acido 7- $\alpha$ -D-glucopiranosil-1-3,5,6,8-tetraidrossi-1-metil-9,10-diossiantracene-2-carbossilico) che si trova complessato con l'alluminio.

**Lacca di garanza:** lacca rossa proveniente dal set di pigmenti 14210 prodotto da Kremer Pigmente GmbH, prevalentemente composta da alizarina (1,2 diidrossiantracene 9, 10 dione) complessata con alluminio.

### 2.2 Preparazione dei substrati metallici

#### 2.2.1 Sintesi di nanostelle d'argento (AgNSs)

La procedura ottimizzata è risultata coincidere con quella descritta da A. Garcia-Leis *et al.* (A. Garcia-Leis *et al.*, 2013). Riassumendo, si è preparato le quattro soluzioni di partenza:

- Soluzione di idrossido di sodio: 0.02g di NaOH (PM= 39.997 g/mol) in 10 ml di acqua MilliQ per ottenere una soluzione 0.05 M.
- Soluzione di idrossilammina: 18  $\mu\text{L}$  di  $\text{NH}_2\text{OH}$  al 50% m/V in 5 mL di acqua MilliQ.
- Soluzione di nitrato d'argento: 0.0016987 g di  $\text{AgNO}_3$  (PM= 169.87 g/mol) in 10 ml di acqua MilliQ per ottenere una soluzione  $1 \times 10^{-3}$  M.
- Soluzione di citrato di sodio: 0.114 g di  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (PM= 249.10 g/mol) in 10 ml di acqua MilliQ per ottenere una soluzione 0.045 M.

A questo punto 500  $\mu\text{L}$  della soluzione di idrossido di sodio sono stati aggiunti a 500  $\mu\text{L}$  di quella di idrossilammina ed il tutto è stato lasciato in agitazione su una piastra magnetica a 670 rpm per un minuto. Si è dunque proceduto con l'aggiunta di 9  $\mu\text{L}$  della soluzione di nitrato d'argento, mantenendo in agitazione nelle stesse condizioni per altri 5 minuti, ed infine di 100  $\mu\text{L}$  di citrato. Dopo 15 ulteriori minuti sulla piastra magnetica, la soluzione assume un colore tendente al verde scuro ed il colloide è pronto.



Figura 2.1: Colloide di AgNSs.

La riduzione degli ioni  $\text{Ag}^+$  avviene ad opera dell'idrossilammina, che agisce da agente riducente primario. Questo composto determina le condizioni per la crescita di nanoparticelle a forma di stella; siccome il processo a temperatura ambiente risulta estremamente lento, l'aggiunta di citrato permette di velocizzare la crescita delle lunghe braccia. Al termine della sintesi, le AgNSs risultano coperte in superficie dagli ioni di questo composto che ne accrescono la stabilità in sospensione; questi ultimi risultano tuttavia facilmente rimovibili dalla superficie delle nanoparticelle in presenza di altre sostanze che presentino una più forte affinità con l'argento, non andando in questo modo a compromettere l'adsorbimento e l'identificazione SERS dell'analita. Il completo sviluppo delle nanoparticelle a partire da un nucleo di morfologia sferica richiede circa 48 ore, trascorse le quali le AgNSs raggiungono un diametro medio di 300-400 nm. Una volta ultimata la sintesi, il colloide è lasciato riposare un giorno prima di procedere con la caratterizzazione.

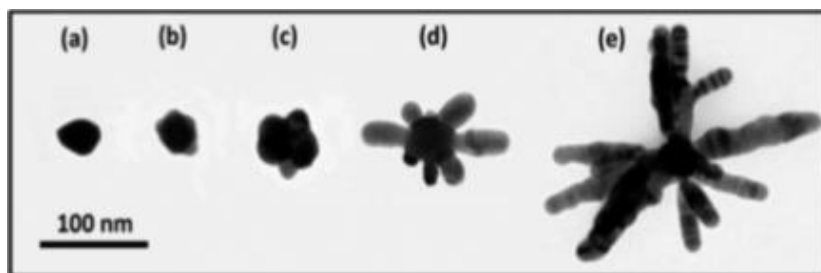


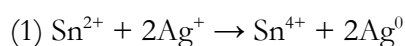
Figura 2.2: Sequenza di crescita dedotta dall'osservazione TEM di diverse AgNPs: con l'aggiunta di idrossilammina si formano AgNPs di morfologia pressoché sferica (a) o piccole nanostelle (b, c); il citrato porta poi allo sviluppo di lunghe braccia (d, e). (A. Garcia-Leis *et al*, 2013)

### 2.2.2 Deposizione *electroless* di nanofili d'oro (AuNWs)

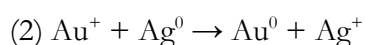
La deposizione elettrochimica dei nanofili d'oro (AuNWs) è stata realizzata utilizzando come *template* membrane di policarbonato con pori dal diametro di 80 nm e seguendo il procedimento descritto da V.P. Menon et C.R.Martin (V.P. Menon e C.R.Martin, 1995) e perfezionata dal gruppo di ricerca del prof. Ugo (De Leo et al., 2007). Dopo una notte a bagno in metanolo, la membrana è stata sensibilizzata con  $\text{Sn}^{2+}$  per immersione in una soluzione 0.026 M di cloruro di stagno ( $\text{SnCl}_2$ ) e 0.07 M di acido trifluoroacetico ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) in 50:50 acqua-metanolo per 45 minuti. Dopo tre lavaggi di un minuto in metanolo, la membrana così sensibilizzata è stata trasferita per 10 minuti in una soluzione 0.029 M di nitrato d'argento ( $\text{AgNO}_3$ ), a cui è stato aggiunto goccia a goccia idrossido di ammonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), fino a quando il policarbonato non ha assunto una colorazione marrone per poi ridivenire trasparente. A questo punto la membrana è stata immersa nella soluzione di doratura composta da  $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$   $7.29 \times 10^{-3}$  M in acqua a cui sono stati aggiunti come stabilizzante 0.8 g di solfato di sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), corrispondenti ad una concentrazione 0.127 M. Per favorire la riduzione degli ioni  $\text{Au}^+$ , dopo 20 minuti è stato unito un primo ml di formaldeide ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) e dopo 40 minuti un secondo, mantenendo il tutto in un bagno dalla temperatura di  $0^\circ\text{C}$ ; l'aggiunta di formaldeide permette di accelerare la crescita dei nuclei d'oro precedentemente formati per sostituzione galvanica dell'argento metallico  $\text{Ag}^0$  da parte dell'oro  $\text{Au}^0$ . Trascorse 24 ore in cui la deposizione *electroless* ha continuato a procedere, la membrana è stata lavata con acqua distillata ed immersa per 12 ore in acido nitrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 10% al fine di rimuovere ogni residuo di stagno ed argento. È stata infine nuovamente lavata con acqua e lasciata asciugare.



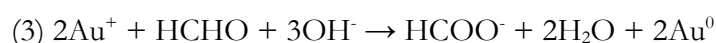
Dopo la prima fase di sensibilizzazione, in cui gli ioni  $\text{Sn}^{2+}$  si adsorbono alle pareti dei pori e alla superficie della membrana formando dei complessi con il polivinilpirrolidone (PVP) che le impregna, si verifica una reazione di ossido-riduzione in cui si formano nanoscopiche particelle d'argento metallico:



Nello step successivo, tali particelle di argento sono galvanicamente sostituite dall'oro in quanto metallo più nobile:



Di conseguenza le pareti dei pori e le facce della membrana si ricoprono di un sottile strato di nanoparticelle d'oro. Queste ultime sono eccellenti siti catalitici per la successiva ossidazione della formaldeide e facilitano pertanto la concomitante riduzione di  $\text{Au}^+$  ad  $\text{Au}^0$ . La doratura procede dunque a partire da questi nuclei grazie all'azione di agente riducente svolta dalla formaldeide secondo la seguente reazione:



Dopo 24 ore di deposizione *electroless* il risultato cui si assiste è la formazione di nanofili d'oro entro i pori della membrana in policarbonato e su entrambe le facce di essa.

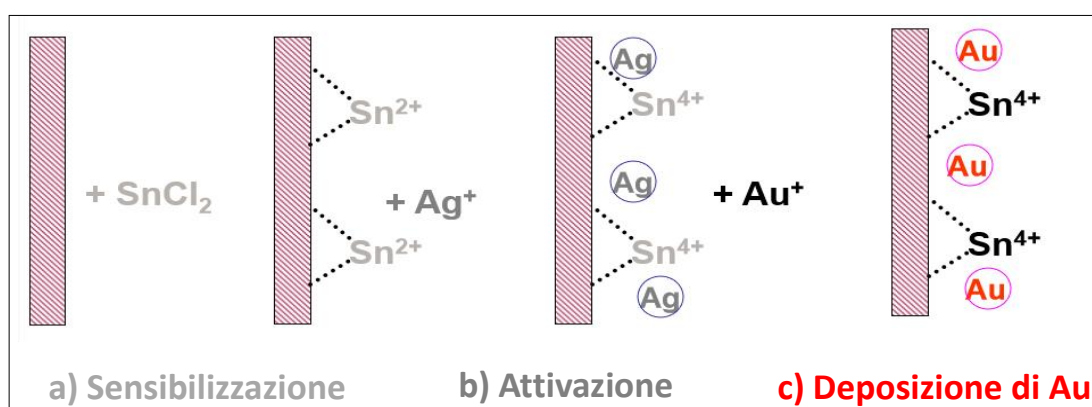


Figura 2.3: Schema riassuntivo della deposizione *electroless*: a) sensibilizzazione con  $\text{Sn}^{2+}$ , b) attivazione in soluzione di  $\text{AgNO}_3$ : gli ioni  $\text{Sn}^{2+}$  sono ossidati a  $\text{Sn}^{4+}$  e gli ioni  $\text{Ag}^+$  sono ridotti ad  $\text{Ag}^0$ , c) riduzione dell'oro: l'argento è galvanicamente sostituito dall'oro poiché metallo più nobile.

Al termine della doratura, la membrana si presenta uniformemente coperta da uno strato d'oro da entrambe le facce (Fig. 2.4).

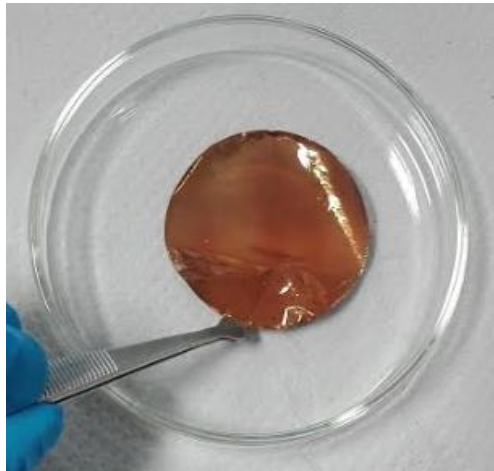


Figura 2.4: Membrana di polycarbonato dorata.

Per far emergere i nanofili è dunque necessario procedere con l'operazione di "pelatura", effettuata con Magic Scotch in corrispondenza del lato che risulta più lucido e brillante. La membrana così pelata assume un colore marrone, che tende al blu se osservata in contro luce. Per concludere, per la rimozione del template in polycarbonato si procede con l'etching chimico totale, effettuato facendo scorrere sulla membrana alcune gocce di diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) puro e sciacquando prima con etanolo per arrestare il processo ed infine con acqua distillata.

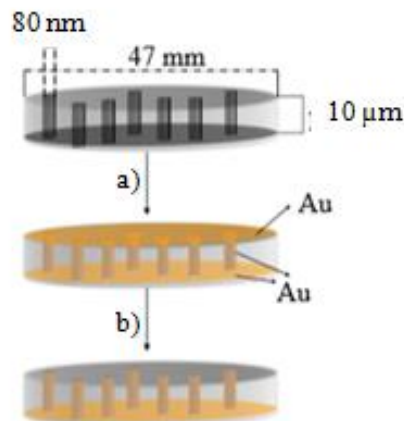


Figura 2.5: a) Deposizione d'oro nel template in polycarbonato e b) successiva rimozione dell'oro da una faccia per far emergere i nanofili.

### 2.2.2.1 Fabbricazione di NEEs (Nano Electrodes Ensembles)

La membrana dorata è il punto di partenza per la fabbricazione dei NEEs, ottenuti seguendo la procedura illustrata in figura 2.6 (M.Silvestrini e P.Ugo, 2012). Per prima cosa un pezzo di nastro conduttivo in rame è stato applicato ad un quadrato dalle dimensioni di circa 10 mm per lato di nastro non conduttivo in alluminio. Una piccola porzione di membrana dorata (circa 5x5 mm) è stata dunque posizionata sui nastri adesivi in modo che soltanto una piccola parte di essa risultasse in contatto col rame, che agisce da conduttore di elettroni. Lo strato d'oro superficiale è stato infine rimosso dalla membrana con Magic Scotch, così da esporre le terminazioni a forma di disco degli AuNWs che costituiscono gli elementi attivi dell'elettrodo.

I NEEs così assemblati sono stati posti in stufa a 150°C per 15 minuti per favorire una parziale fusione del polycarbonato e la conseguente saldatura dei vari elementi. Per concludere, i due nastri di alluminio e rame e la membrana sono stati fissati sotto e sopra con del nastro isolante su cui precedentemente era stato praticato un foro dal diametro di 3 mm in corrispondenza dei nano elettrodi.

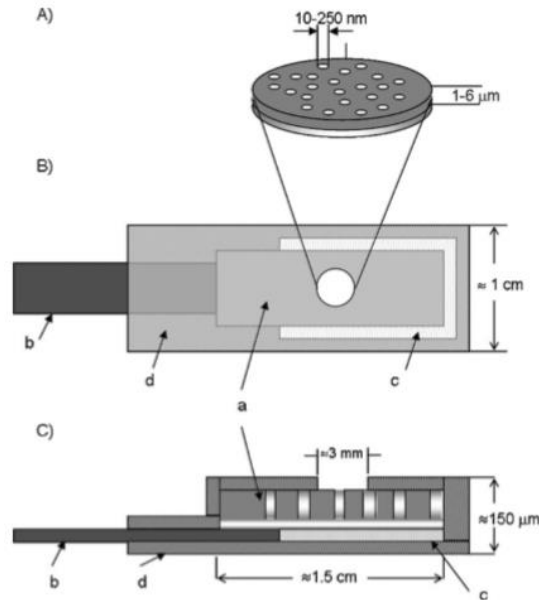


Figura 2.6: Rappresentazione schematica della fabbricazione di un NE: a) particolare della superficie attiva; B) vista dall'alto e C) sezione laterale. (a): membrana di polycarbonato dorata ed *etchata*; (b) nastro conduttivo in rame; (c) nastro non conduttivo in alluminio; (d) nastro isolante.

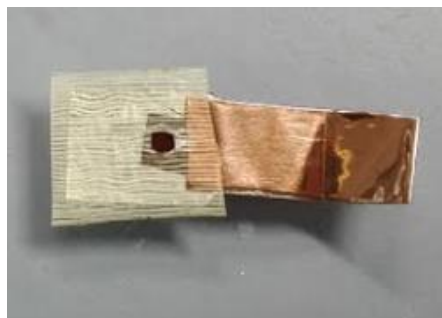


Figura 2.7: Un NEE.

### 2.2.3 Metodologie elettrochimiche

Sia per le analisi mediante voltammetria ciclica che per le deposizioni in condizioni potenziostatiche sono state impiegate celle a tre elettrodi, operando a temperatura ambiente. L'elettrodo di riferimento utilizzato era  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$  in alcuni esperimenti ed una lastrina di rame in altri, il contro elettrodo era invece una spirulina in platino o una lastrina in rame. Per le misure voltammetriche gli elettrodi lavoranti erano elettrodi lucidati a specchio con allumina nei seguenti materiali: glassy carbon (GC) dal diametro di 5 mm, oro (Au) o rame (Cu) dal diametro di 3 mm.

L'assemblaggio degli elettrodi usati per la deposizione in membrane nanoporose è descritto nel dettaglio nei paragrafi successivi.

### 2.2.4 Deposizione elettrochimica di nanofili di rame (CuNWs)

I nanofili di rame sono stati preparati per via elettrochimica sfruttando come stampo due membrane differenti, in policarbonato ed in ossido di alluminio. In entrambi i casi, prima di procedere con la deposizione, una delle facce della membrana è stata rivestita di un sottile film di atomi d'oro mediante *sputtering*; la procedura è volta ad aumentare la conducibilità fra la membrana stessa e la superficie dell'elettrodo durante la deposizione. La membrana è stata dunque posizionata sulla superficie di un elettrodo di lavoro, successivamente inserito in una cella elettrochimica insieme ad un contro elettrodo e ad un elettrodo di riferimento, tutti immersi in una soluzione elettrolitica di solfato di rame acidificata con acido solforico. Attraverso un potenziostato è stato dunque applicato un potenziale riducente costante per dare avvio alla riduzione degli ioni  $\text{Cu}^{2+}$  a rame metallico e, di conseguenza, al riempimento

dei pori. La deposizione è stata seguita mediante cronoamperometria, studiando man mano l'andamento della curva intensità di corrente vs tempo registrata (Fig. 2.8).

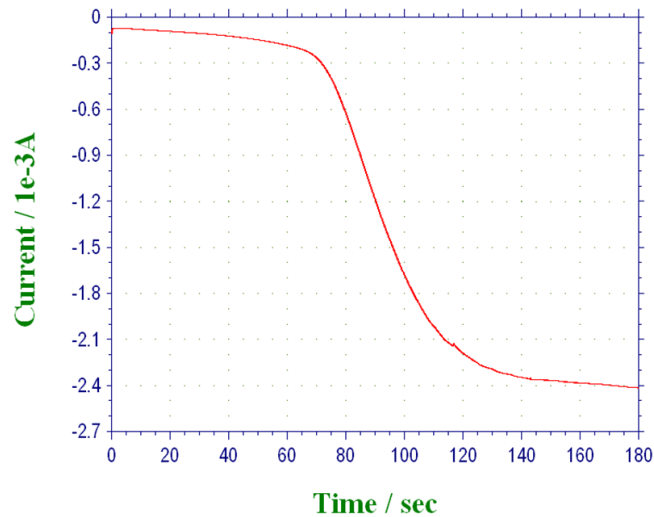


Figura 2.8: Esempio di cronoamperogramma registrato durante la deposizione.

Al termine della procedura gli elettrodi sono stati lavati con acqua bidistillata per rimuovere ogni residuo di ioni  $\text{Cu}^{2+}$  e fatti asciugare in vista dell'etching e della caratterizzazione col microscopio elettronico SEM-EDX.

Di seguito si riportano più nel dettaglio le diverse procedure seguite per la preparazione degli elettrodi e per la deposizione di CuNWs sulle membrane di policarbonato e allumina.

#### 2.2.4.1 Deposizione di CuNWs in membrane di policarbonato

La deposizione è stata effettuata su membrane di policarbonato SPI-pore dallo spessore di  $10\ \mu\text{m}$  e aventi pori dal diametro di 400 o 200 nm per una densità di  $1 \times 10^8$  pori/ $\text{cm}^2$ .

Dalla membrana di policarbonato precedentemente dorata da un lato sono stati ricavati dei dischetti dal diametro di circa 3 mm, i quali sono stati applicati alla superficie di un elettrodo di lavoro rivestito in teflon attraverso alcune micro gocce (circa  $7\ \mu\text{L}$ ) di Nafion 117 (una colla polielettrolitica) diluito allo 0.5 % in metanolo. Durante questa operazione la faccia dorata della membrana deve essere posta in contatto con la superficie metallica dell'elettrodo e bisogna fare in modo, esercitando una leggera pressione, che il film polimerico aderisca in modo uniforme, senza distaccarsi o sollevarsi ai lati.

Una volta preparato l'elettrodo, la deposizione elettrochimica è stata effettuata immergendolo direttamente nella soluzione di solfato di rame con cui la cella elettrochimica

era stata precedentemente riempita. La deposizione è stata effettuata in alcuni casi ad un potenziale di -450 mV per i primi 10 secondi (accorgimento che favorisce il riempimento della base dei pori) per poi essere proseguita per altri 110 secondi a -250 mV, mentre in altri è stata protratta per 120 secondi a -250 mV, senza predeposizione.

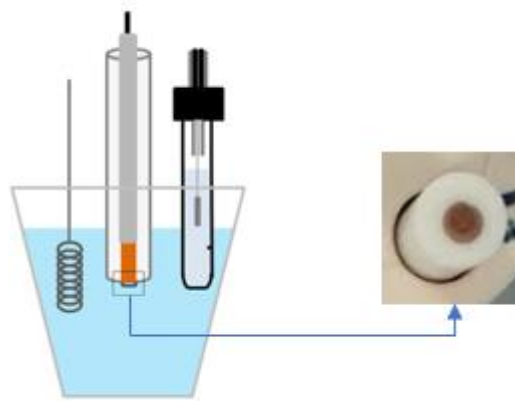


Figura 2.9: Rappresentazione schematica della cella elettrochimica e particolare della membrana di policarbonato applicata sull'elettrodo di lavoro.

Al termine gli elettrodi sono stati sottoposti ad un *etching* chimico totale in immersione in diclorometano puro per un minuto al fine di rimuovere il template in policarbonato.

#### 2.2.4.2 Deposizione di CuNWs in membrana di allumina

La deposizione è stata effettuata su membrane di allumina Anodisc47 dallo spessore di 60  $\mu\text{m}$  e aventi pori dal diametro di 200 nm per una densità di  $1 \times 10^{11}$  pori/ $\text{cm}^2$ .

A causa del maggiore spessore e della grande fragilità delle membrane di allumina, non è stato possibile ricavare dei dischetti di forma regolare, per cui si è optato per adoperarle in piccoli frammenti. Anche in questo caso la membrana è stata applicata sulla superficie dell'elettrodo di lavoro in corrispondenza della faccia dorata servendosi del Nafion 117, usato stavolta puro. Tuttavia, dal momento che a causa della scarsa affinità fra i due materiali non è stato possibile ottenere una buona adesione, per un ulteriore fissaggio si è deciso di impiegare una striscia di parafilm su cui è stato praticato un foro dal diametro di circa 3 mm da collocare in corrispondenza della superficie metallica dell'elettrodo.

Si è pertanto proceduto con la deposizione elettrochimica, realizzata stavolta non per immersione diretta dell'elettrodo nella soluzione di solfato di rame, ma servendosi di una spugna precedentemente condizionata per due ore in essa (Gambirasi et al., 2011).

L'elettrodo con la membrana è stato pertanto spinto a ridosso della spugna, così da garantire con la pressione da essa esercitata una buona adesione durante la deposizione. Un secondo tentativo ha tuttavia rivelato che il solo parafilm può essere sufficiente a mantenere la membrana a contatto con l'elettrodo, motivo per cui l'espedito della spugna è stato tralasciato nelle successive deposizioni.

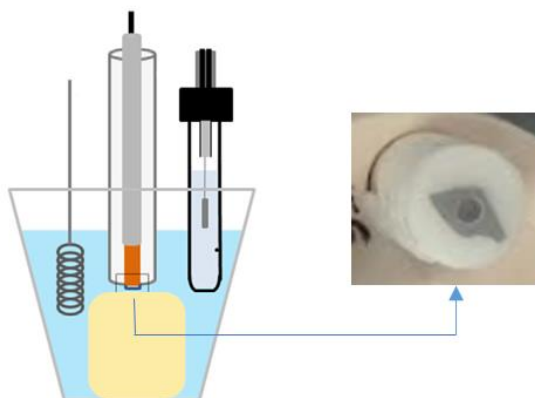


Figura 2.10: Rappresentazione schematica della cella elettrochimica e particolare della membrana di allumina applicata sull'elettrodo di lavoro col parafilm.

Per quanto riguarda il tempo di deposizione, dopo gli eventuali primi 10 secondi di predeposizione a  $-450$  mV, è stato stabilito andando a guardare l'andamento del cronoamperogramma: quando la corrente inizia ad aumentare in modo significativo bisogna arrestare il processo in quanto ciò è indice della crescita del metallo al di fuori dei pori. Su questa base il potenziale di  $-250$  mV è stato imposto per 500 secondi, interrompendolo poi quando necessario a seconda dei casi.

Al termine della procedura le membrane sono state sottoposte ad un etching in NaOH 2 M, dopodiché caratterizzate al SEM-EDX.

### 2.2.4.3 Ottimizzazione della deposizione di CuNWs

In vista dei risultati ottenuti si è deciso di indagare se andando a modificare alcuni parametri sperimentali fosse possibile ottimizzare la deposizione elettrochimica dei CuNWs. In particolare ci si è concentrati sulle membrane in allumina, per le quali il metodo era meno consolidato, e gli aspetti presi in considerazione sono quelli di seguito descritti.

### Tempo di predoratura della membrana:

Durante la prima fase del lavoro l'osservazione al SEM della faccia dorata della membrana in allumina aveva rivelato che soltanto una piccola quantità di questo metallo si era depositata nei pori. Si è voluto dunque verificare se aumentando il tempo dello *sputtering* la deposizione dei CuNWs potesse trarre dei vantaggi. Una membrana è stata pertanto suddivisa in due parti, di cui una è stata dorata per 30 secondi e l'altra per 60 secondi, dopodiché entrambe sono state analizzate e caratterizzate col microscopio elettronico SEM-EDX. Dopo entrambi i tempi è stato possibile osservare che i pori della membrana non risultano occlusi, non pregiudicando dunque la possibilità di effettuare la deposizione dei nanofili di rame. La deposizione è stata inoltre testata in assenza di predoratura.

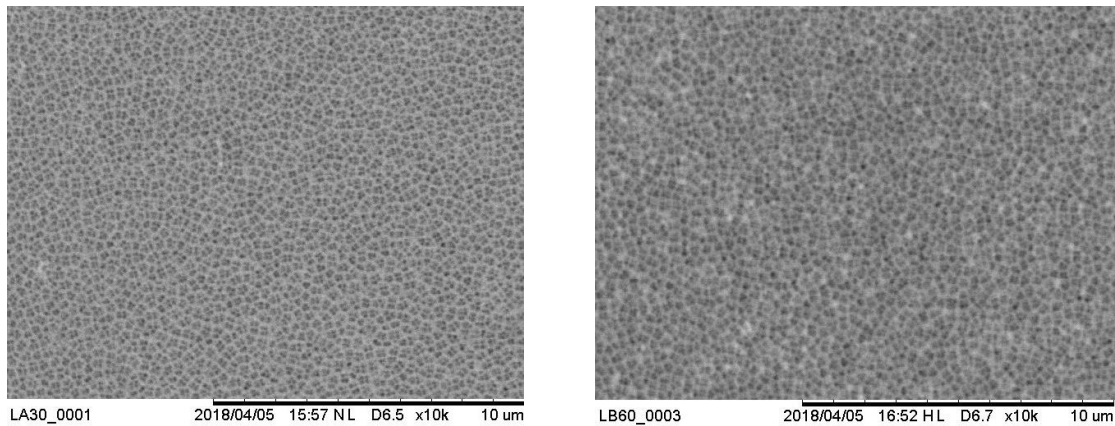


Figura 2.11: Immagini al SEM della membrana in allumina dopo 30 e 60 s di doratura.

### Tempo di deposizione

Sono state eseguite diverse prove per stabilire, studiando di volta in volta l'andamento del cronoamperogramma acquisito, il tempo ottimale di deposizione, ovvero quello necessario per riempire i pori del *template* senza però che il rame cresca oltre i pori, dando origine a strutture a forma di fungo. Si è inoltre valutata la necessità di effettuare o meno la predeposizione ad un potenziale più fortemente riducente.



### Etching del template:

Sia nel caso del policarbonato che soprattutto dell'allumina, la rimozione della membrana a deposizione ultimata si era rivelata incompleta, pertanto sono stati testati metodi di rimozione del *template* potenzialmente più efficaci. Per quanto riguarda il policarbonato il tempo di immersione in diclorometano puro è stato aumentato a due minuti, mentre nel caso dell'allumina la concentrazione di idrossido di sodio è stata portata da 2 a 5 M, prolungando il tempo da 5 a 15 minuti. Per il policarbonato il nuovo metodo si è rivelato troppo invasivo, tanto da portare al distacco e alla conseguente scomparsa dei CuNWs dalla superficie dell'elettrodo, mentre per l'allumina ha portato a considerevoli miglioramenti, sebbene permangano ancora tracce di *template*.

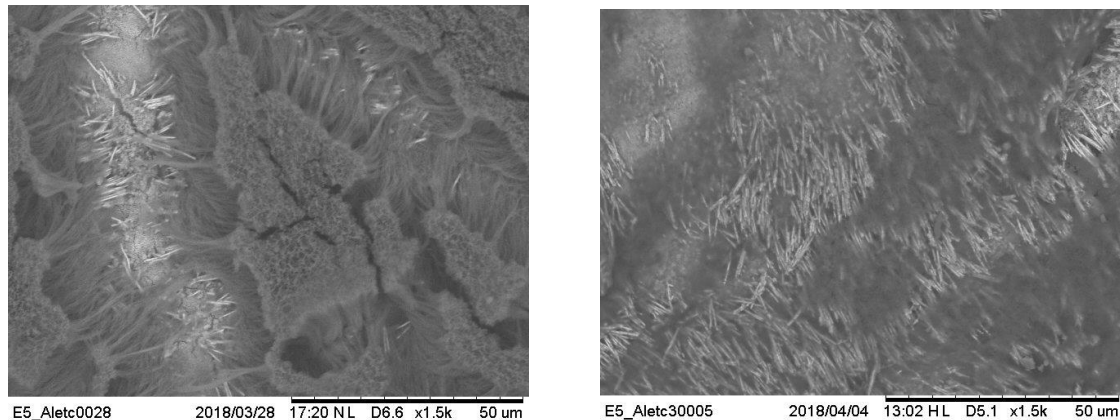


Figura 2.12: Confronto fra *etching* con NaOH 2 e 5 M eseguito sulla stessa membrana in allumina.

### Elettrodo di lavoro

Oltre che su elettrodi di lavoro in rame, la crescita dei CuNWs è stata sperimentata anche sul glassy carbon.

### Soluzione di deposizione

Il comportamento ossido-riduttivo del rame è stato studiato mediante voltammetria ciclica in quattro diverse soluzioni, di cui due contenenti soltanto solfato di rame ed acido solforico e due con solfato di sodio come ulteriore elettrolita di supporto. La quinta soluzione è stata infine preparata in vista delle considerazioni tratte dalle misure voltammetriche sulle precedenti:

1.  $\text{CuSO}_4$  0,6 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 M (Stortini et al., 2015)
2.  $\text{CuSO}_4$  0,88 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,55 M (Gambirasi et al., 2011)
3.  $\text{CuSO}_4$  0,05 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  2 M (Blanco et al., 2014)
4.  $\text{CuSO}_4$  0,01 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 M,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5 M
5.  $\text{CuSO}_4$  0,3 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 M,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1 M.

Obiettivo finale dello studio è stato scegliere la soluzione ed il potenziale riducente migliori da adottare per la deposizione elettrochimica dei CuNWs entro le membrane in allumina e policarbonato.

Per questa deposizione è stato inoltre modificato l'assetto della cella elettrochimica, utilizzandone una così composta: elettrodo di lavoro, contro elettrodo in rame a forma di L, elettrodo di riferimento in rame. La scelta di utilizzare come contro elettrodo il rame invece che il platino è dettata dal fatto che in questo modo, man mano che il rame si riduce all'elettrodo lavorante, contemporaneamente si ossida al contro elettrodo, garantendo così un continuo ricambio di ioni  $\text{Cu}^{2+}$  e non impoverendone dunque la soluzione; usando il contro elettrodo in platino la riduzione sarebbe invece stata a carico dell'acqua, sviluppando  $\text{H}_2$ .

In queste condizioni per indurre la riduzione degli ioni  $\text{Cu}^{2+}$  è stato applicato un potenziale di -400 mV, eventualmente preceduto da una predeposizione a -600 mV.



Figura 2.13: Cella elettrochimica a tre elettrodi impiegata per le deposizioni.

## 2.4 Preparazione dei campioni

Le analisi SERS sono state eseguiti su otto diversi supporti in modo da poter confrontare fra loro e valutare l'efficacia di diversi substrati metallici o nanostrutturati, gerarchici e non:

- Vetrino da microscopio dorato
- Vetrino dorato + AgNSs
- AuNWs
- AuNWs + AgNSs
- Lastrina di rame
- Lastrina di rame + AgNSs
- CuNWs
- CuNWs + AgNSs

Per prima cosa tutti i campioni sono stati funzionalizzati per immersione overnight in una soluzione acquosa di cisteamina 10 mM in modo da favorire il legame fra substrato, nanoparticelle ed analita, dopodiché sono stati preparati come di seguito descritto:

- Vetrino da microscopio dorato: nessun trattamento.
- Vetrino dorato + AgNSs: alcune gocce di colloide sono state depositate sul vetrino con una pipetta pasteur, dopodiché il solvente è stato lasciato evaporare prima di ripetere la procedura per un totale di tre deposizioni. Nel caso dei coloranti per ottenere un Raman *enhancement* ancor maggiore il colloide è stato precedentemente concentrato.
- Nanofili di oro: un frammento di membrana dorata è stato applicato ad un vetrino da microscopio, pelato con Magic Scotch ed infine sottoposto ad *etching* chimico totale facendovi scorrere sopra da una pipetta pasteur alcune gocce ( $\approx 7$ ) di diclorometano puro. L'*etching* è stato infine arrestato lavando con alcune gocce di etanolo.
- Nanofili di oro + AgNSs: le membrane d'oro pelate ed *etchate* sono state immerse per un giorno nella sospensione colloidale di AgNSs per l'analisi del benzentiolo, mentre nel caso dei coloranti 1  $\mu\text{L}$  di colloide concentrato è stato depositato direttamente su di esse.
- Lastrina di rame: nessun trattamento.

- Lastrina di rame + AgNSs: la procedura seguita è la stessa descritta per il vetrino dorato + AgNSs.
- Nanofili di rame: vista l'impossibilità di separare la membrana dalla superficie degli elettrodi, una volta effettuato l'*etching* chimico del *template*, la preparativa e le analisi sono state eseguite direttamente su di essi.
- Nanofili di rame + AgNSs: la procedura seguita è la stessa descritta per i nanofili d'oro + AgNSs.

Per concludere, i campioni sono stati immersi per una notte nella soluzione contenente l'analita.

### 2.4.1 Benzentiolo

Prima di passare allo studio dei coloranti d'interesse artistico, le analisi SERS sono state eseguite sui diversi campioni utilizzando come sonda il benzentiolo, molecola organica i cui segnali Raman sono notoriamente ben definiti e di grande intensità.

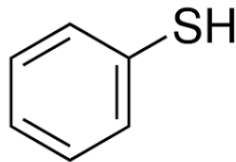


Figura 2.14: Struttura chimica del benzentiolo.

Sono pertanto state preparate tre soluzioni di benzentiolo in etanolo a tre diverse concentrazioni ( $10^{-3}$  M,  $10^{-5}$  M e  $10^{-6}$  M), in cui gli otto diversi substrati, preparati come precedentemente descritto, sono stati lasciati in immersione per una notte prima di effettuare le misure SERS. Data la forte intensità dei segnali Raman generati da questo composto, nel caso delle nanostelle d'argento non è stato necessario concentrare il colloide.

### 2.4.2 Coloranti organici

Rispetto al benzentiolo le molecole dei coloranti organici danno origine a segnali SERS molto meno intensi, motivo per cui la preparazione dei campioni ha richiesto un ulteriore passaggio: la concentrazione delle nanostelle d'argento. Il procedimento seguito è il

seguinte: 500  $\mu\text{L}$  di colloide sono stati posti in un'eppendorf e centrifugati a 8000 rpm per cinque minuti, trascorsi i quali 400  $\mu\text{L}$  di surnatante sono stati prelevati e sostituiti da un'uguale quantità di AgNSs diluite. La procedura è stata ripetuta per tre volte, disperdendo dopo ogni nuova aggiunta le nanostelle depositatesi sul fondo in modo da evitare di concentrare eventuali sali formatisi. Al termine, una goccia da 1  $\mu\text{L}$  di colloide concentrato è stata prelevata dal fondo dell'eppendorf e depositata sui diversi campioni, dove è stata lasciata asciugare ed infine sciacquata con acqua distillata per rimuovere eventuali sali.

Per testare i diversi sistemi, ciascuno dei campioni è stato immerso per una notte in una soluzione del colorante a concentrazione  $10^{-3}\text{M}$  nel caso del carminio e  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$  nel caso della lacca di garanza. Prima di procedere sono stati eseguiti alcuni test di solubilità che hanno rivelato come in entrambi i casi il metanolo fosse il solvente più adatto.

Colorante	Solvente	Soluzione
Carminio	Metanolo	0.0499 g in 100 mL
Lacca di garanza	Metanolo	0.0120 g in 100 mL

Tabella 2.1: Composizione delle soluzioni di coloranti preparate.

### 2.4.3 Mock-up di rosso carminio e lacca di garanza

Per verificare la possibilità di utilizzare i sistemi gerarchici di nanostrutture messi a punto su cross section e frammenti provenienti da opere d'arte, alcune prove SERS preliminari sono state effettuate su campioni pseudo-reali. A tale scopo sono stati impiegati dei mock-up di carminio in tempera ed olio e di lacca di garanza in tempera, preparati mescolando 0.5 g di polvere di ciascun colorante con 0.5 g di legante (olio di lino o uovo) e stendendo a pennello su un vetrino da microscopio il composto così ottenuto (Zalaffi, 2015).

Per acquisire lo spettro SERS, alcune gocce di un solvente adatto sono state depositate sui mock-up, dopodiché, trascorsi alcuni secondi, sono state prelevate nuovamente con la pipetta pasteur e poste sui substrati preparati e funzionalizzati con cisteammina come precedentemente descritto. In questa fase esplorativa la scelta del solvente è stata effettuata in modo empirico, ricadendo nel caso della tempera su acido cloridrico e nel caso dell'olio su un solvente organico, il dimetilsolfossido.

## 2.4 Strumentazione impiegata

### 2.4.1 Spettrometro $\mu$ -Raman

Per le analisi  $\mu$ -Raman è stato impiegato uno spettrometro B&W Tek (Newark, DE, USA) i-Raman 785S. Gli spettri sono stati acquisiti mediante un laser a diodi di lunghezza d'onda 785 nm di potenza variabile per evitare effetti termici sul campione (potenza massima: 300 mW, regolabile da un minimo di 3 mW attraverso variazioni dell'1%) e con una risoluzione spettrale nominale di  $4.5 \text{ cm}^{-1}$ . Lo spettrometro è accoppiato con un microscopio Olympus BX51, equipaggiato con un obiettivo 20x. Gli spettri sono stati acquisiti nel range spettrale  $175\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$  con un tempo di integrazione di 20 secondi e facendo 3 cicli di accumuli per migliorare il rapporto segnale-rumore. Per la raccolta dei dati è stato utilizzato il software dedicato BWspec4 e per l'elaborazione Origin 8.0.

Si ringraziano la dott.ssa Lavinia De Ferri ed il professor Pojana del laboratorio di Caratterizzazione dei materiali dell'Università Cà Foscari di Venezia per averci messo a disposizione il loro strumento.

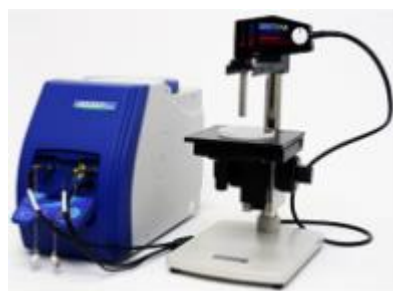


Figura 2.15: Strumentazione  $\mu$ -Raman impiegata per le analisi.

Per eseguire l'analisi i campioni sono stati collocati sullo stage del microscopio, dopodiché con l'aiuto della camera digitale annessa allo strumento si è scelto il punto della superficie su cui effettuare la misura e si è regolata la messa a fuoco. Nel caso dei nanofili di rame, vista l'impossibilità di separarli dalla superficie degli elettrodi, gli spettri SERS sono stati acquisiti collocando direttamente questi ultimi al di sotto dell'obiettivo. La potenza è stata settata di volta in volta per ciascun campione in modo da trovare il valore ottimale, atto a massimizzare l'intensità e la risoluzione dello spettro senza saturare il rivelatore o dar luogo a fenomeni termici. Nella maggior parte dei casi il valore ottimale si è rivelato compreso fra il 5 ed il 10 % (ovvero tra 15 e 30 mW).

## 2.4.2 Microscopi elettronici SEM, FE-SEM e TEM

Le analisi SEM-EDX sono state effettuate usando un microscopio a scansione elettronica TM3000 Hitachi accoppiato col sistema SwiftED3000 per microanalisi di fluorescenza X. Andando ad analizzare campioni metallici, e pertanto già di per sé conduttivi, non è stato necessario alcun pretrattamento: gli AuNWs sono stati analizzati applicando piccole porzioni di membrana sullo stage mediante scotch conduttivo, mentre per i CuNWs l'osservazione è stata effettuata direttamente sugli elettrodi, avvitati all'apposito supporto. Le analisi sono state effettuate mantenendo la potenza del fascio di elettroni a 15 keV e, nel caso degli spettri EDX, il tempo di acquisizione è stato di 3 minuti.

L'osservazione nel dettaglio è stata invece eseguita con un microscopio elettronico a scansione con sorgente ad emissione di campo (FE-SEM) Sigma-VP Carl Zeiss, strumento che permette di acquisire immagini ad altissimo ingrandimento, con risoluzione intorno al nanometro. Per l'osservazione delle nano particelle d'argento è stato invece utilizzato un microscopio elettronico a trasmissione (TEM) JEOL 3010 operante a 300 kV ed equipaggiato con una camera CCD Gatan (modello 794) e con un detector EDS Oxford Instrument (Model 6636). Si ringrazia per le analisi FE-SEM e TEM la professoressa Patrizia Canton dell'Università Cà Foscari di Venezia.

## 2.4.3 Spettrofotometro UV-Vis

Gli spettri di assorbanza sono stati acquisiti con uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 900, considerando la finestra spettrale compresa fra 200 e 1100 nm. Per prima cosa è stata registrata la linea di base effettuando la misura con entrambe le cuvette di quarzo, quella di riferimento e quella per il campione, riempite con 3 mL di acqua. A seguire gli spettri di assorbanza sono stati acquisiti inserendo nella cuvetta corrispondente al campione 2 mL di acqua ed 1 mL di colloide. Per l'elaborazione dei dati è stato impiegato il software Origin 8.0.

## 2.4.4 Potenzio stato

Per la deposizione dei CuNWs e le misure elettrochimiche è stato impiegato un potenziostato CH1000 (CH Instruments, USA), strumento che permette di utilizzare diverse tecniche elettrochimiche fra cui la voltammetria ciclica ed amperometrica i-t.

Tutte le misure sono state condotte in una cella elettrochimica a tre elettrodi (elettrodo di lavoro, elettrodo di riferimento e contro elettrodo) collegati allo strumento mediante morsetti e impostando di volta in volta i parametri richiesti.



## 3. RISULTATI

### 3.1 Nanoparticelle e nanofili: analisi e caratterizzazione

#### 3.1.1 Nanostelle d'argento (AgNSs)

L'ottimizzazione della produzione di AgNSs è stata condotta studiando l'influenza del pH. Questo parametro riveste infatti un ruolo fondamentale nella formazione e nella crescita delle nanostelle, in quanto la distribuzione delle cariche negative sulla superficie dei primi nuclei sferici che si originano durante la sintesi, dipendente appunto dal pH dell'ambiente di reazione, è determinante per la morfologia finale. Il pH, misurato al termine della preparazione delle nanoparticelle, deve risultare compreso fra 8 e 10: un pH acido ( $\approx 6.6$ ) pregiudica infatti la formazione delle nanostelle, mentre uno fortemente basico ( $\approx 11.4$ ) porta ad un sistema polidisperso di nanostelle e nanosfere.

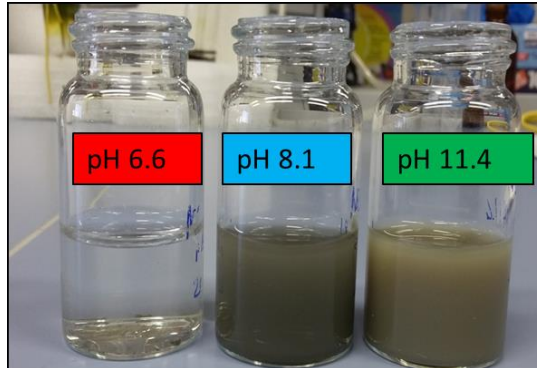


Figura 3.1: Colloide preparato a diversi pH: in ambiente acido le AgNSs non si formano, mentre in ambiente basico si ottiene un sistema polidisperso di nanostelle e nanosfere.

L'effetto del pH è stato verificato analizzando l'LSPR (*Local Surface Plasmon Resonance*) mediante spettroscopia d'assorbimento UV-Vis ed osservando la morfologia al microscopio a trasmissione elettronica (TEM).

Lo spettro UV-Vis delle AgNSs deve presentare un massimo compreso fra 370 e 380 nm, associato ad un ulteriore assorbimento a lunghezze d'onda maggiori (intorno a 750 nm); la

spiegazione di questo doppio assorbimento risiede nella particolare forma di queste nanoparticelle, composte da un nucleo centrale e da molte braccia. Tale duplice LSPR è inoltre il responsabile di un'amplificazione dell'effetto Raman ancora maggiore ( $\approx 10^8$ ). Nel caso invece di sistema polidisperso nello spettro UV-Vis compare una spalla intorno a 430 nm, imputabile all'assorbimento delle nanosfere (Fig. 3.2).

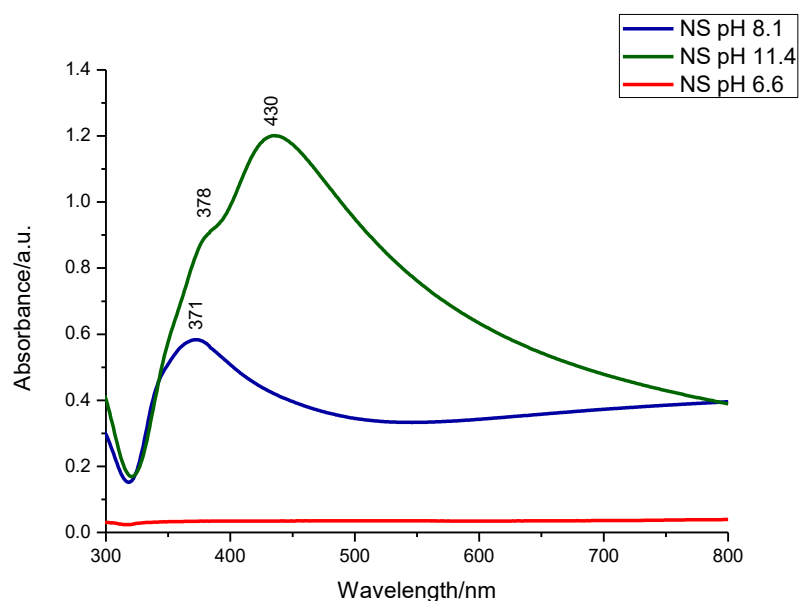


Figura 3.2: Spettri d'assorbimento UV-Vis ai diversi pH.

L'osservazione al TEM rivela invece la morfologia delle nanoparticelle, caratterizzate dalla peculiare forma a stella.

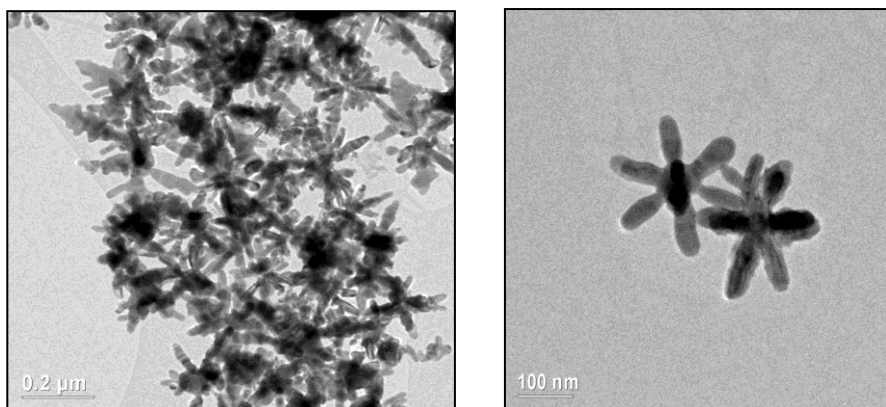


Figura 3.3: Immagini al TEM di AgNSs.

### 3.1.2 Nanofili d'oro (AuNWs)

Una volta terminata la deposizione *electroless* ed effettuata la pelatura della membrana, la crescita dei nanofili d'oro è stata verificata mediante osservazione al microscopio elettronico SEM-EDX ed FE-SEM. L'immagine al SEM (fig. 3.4a) mostra la superficie dei nanofili d'oro che emergono dai pori del *template* e mette in luce come gli AuNWs non siano disposti parallelamente l'uno rispetto all'altro, ma con una distribuzione angolare variabile, conseguenza del processo di *track-etching* (C. Schönenberger et al.,1997). È possibile migliorare la risoluzione dell'immagine e distinguere con maggiore chiarezza i nanofili dopo la rimozione della membrana mediante *etching* chimico in diclorometano puro (fig.3.4b).

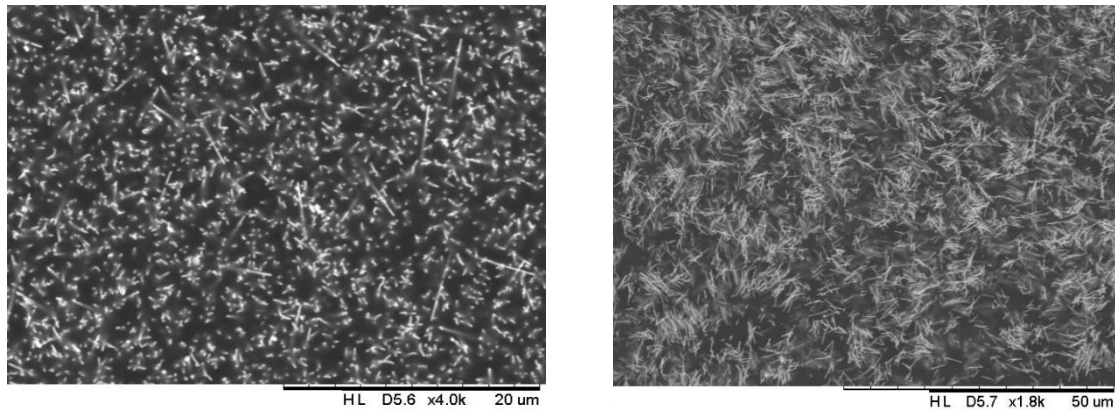


Figura 3.4: Immagini al SEM degli AuNWs prima (a) e dopo (b) l'*etching* del *template*.

I nanofili d'oro presentano un'orientazione casuale che rispecchia quella dei pori della membrana. Gli AuNWs, ancora parzialmente intrappolati nel policarbonato, hanno una lunghezza di circa 7-8 µm ed un diametro di circa 80 nm. Il dettaglio è stato infine esaminato col microscopio FE-SEM per verificare la continuità dei fili nei pori e valutare l'area superficiale esposta alla soluzione.

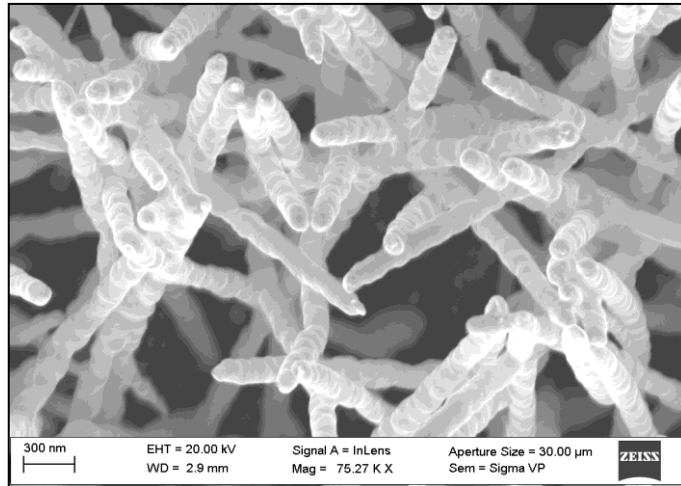


Figura 3.5: Dettaglio al FE-SEM degli AuNWs.

Un'ulteriore caratterizzazione dei nanofili d'oro può essere effettuata andando ad acquisire lo spettro EDX su una porzione di membrana. L'analisi elementare, come auspicabile, conferma la presenza di oro, associato al carbonio e all'ossigeno attribuibili al policarbonato (Fig 3.6).

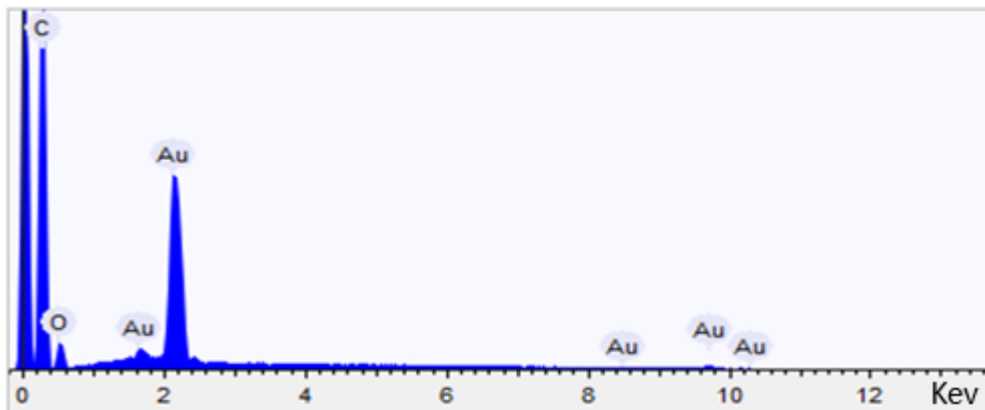


Figura 3.6: Spettro EDX acquisito dalla zona illustrata in fig. 3.2a: lo spettro presenta i picchi dell'oro associati a quelli di policarbonato ed ossigeno.

### 3.1.2.1 Caratterizzazione elettrochimica dei NEEs

Una volta realizzati, i NEEs possono essere caratterizzati elettrochimicamente mediante voltammetria ciclica andando a studiare il comportamento ossido-riduttivo dello ione  $\text{FA}^+$  in soluzione. In questo modo è possibile valutare se la sintesi dei nanofili d'oro e l'assemblaggio dei vari elementi del NEE sono avvenute con successo. In particolare, un problema assai frequente che può compromettere il funzionamento degli insiemi di nanoelettrodi è la mancata sigillatura fra la zona conduttiva e il materiale isolante circostante, che può causare un netto aumento della corrente di carica del doppio strato (Menon et Martin, 1995).

Si prepara dunque una cella elettrochimica contenente 10 ml di una soluzione 0.1 nM di  $\text{FA}^+$  e 5 mM di  $\text{KNO}_3$ , l'elettrolita di supporto, in cui vengono inseriti i tre elettrodi di riferimento, ausiliario e di lavoro, costituito dal NEE stesso. Questi vengono dunque collegati ad un potenziostato e si dà avvio alla misura ciclovoltammetrica, eseguendo una scansione triangolare dei potenziali che va da + 0.2 a + 0.8 V e viceversa. Una volta acquisito il voltammogramma ciclico, per valutare l'effettivo funzionamento del NEE bisogna verificare che la differenza fra picco anodico e catodico ( $\Delta E = E_{\text{pa}} - E_{\text{pc}}$ ) sia compresa fra 0.06 e 0.08 V, che il rapporto fra l'intensità dei due picchi corrisponda circa ad 1 ed infine che il tracciato voltammetrico sia ben definito, senza altri picchi oltre ai due di ossidazione e riduzione del  $\text{FA}^+$ . Se così non fosse, significherebbe infatti che la saldatura tra l'alluminio ed il rame non è avvenuta con successo e della soluzione è percolata tra i due, rendendo il NEE inutilizzabile.

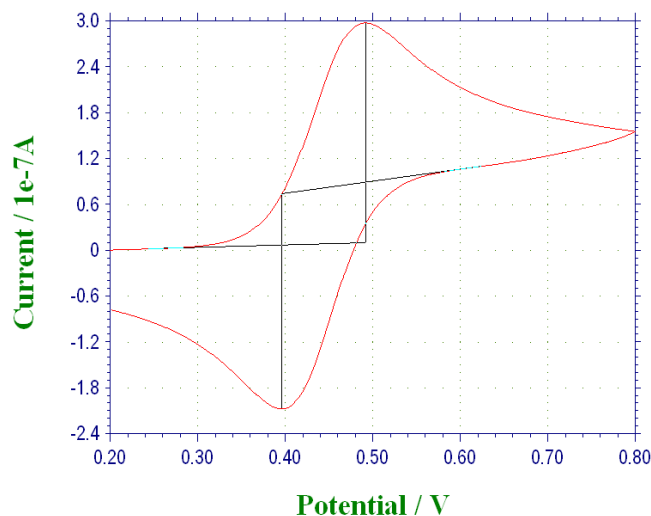


Figura 3.7: Voltammogramma registrato impiegando un NEE come elettrodo di lavoro.

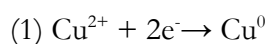
### 3.1.3 Nanofili di rame (CuNWs)

#### 3.1.2.2 Studio voltammetrico della riduzione di ioni $\text{Cu}^{2+}$

Al fine di individuare le condizioni ideali per la deposizione elettrochimica del rame, sono state condotte alcune analisi preliminari mediante voltammetria ciclica in soluzioni di solfato di rame ( $\text{CuSO}_4$ ) a concentrazione compresa tra 0.01 e 0.88 M in acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) da 0.005 a 0.55 M, in assenza o in presenza di solfato di sodio  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (da 0.5 a 2 M). Per le misure sono stati impiegati diversi elettrodi di lavoro: in glassy carbon, rame o oro.

Per semplicità di seguito si presenteranno e discuteranno nel dettaglio soltanto i voltamogrammi ciclici ottenuti per la soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,01 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.01 M e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M; per i risultati ottenuti con diverse composizioni di elettrolita si rimanda invece all'Appendice B.

I voltamogrammi registrati sull'elettrodo lavorante in rame sono caratterizzati nel tratto catodico da un picco di corrente che cade a -0.180 V ad una velocità di scansione di 10 mV/s, a -0.290 a 80 mV/s (vs  $\text{Cu}_{\text{ref}}$ ). Nella curva del tratto anodico si osserva invece una crescita quasi lineare della corrente a potenziali maggiori o circa uguali a +0.02 V (vs  $\text{Cu}_{\text{ref}}$ ). Il picco di riduzione, la cui corrente cresce approssimativamente con la radice quadrata della velocità di scansione, è attribuibile alla reazione di riduzione dello ione  $\text{Cu}^{2+}$  che diffonde in soluzione e reagisce secondo la reazione:



La corrente osservata durante l'ossidazione nel caso di elettrodo lavorante in rame cresce senza individuare un picco perché corrispondente all'ossidazione a  $\text{Cu}^{2+}$  del rame metallico sia depositato durante il ramo catodico della scansione che del rame massivo che costituisce l'elettrodo lavorante stesso.

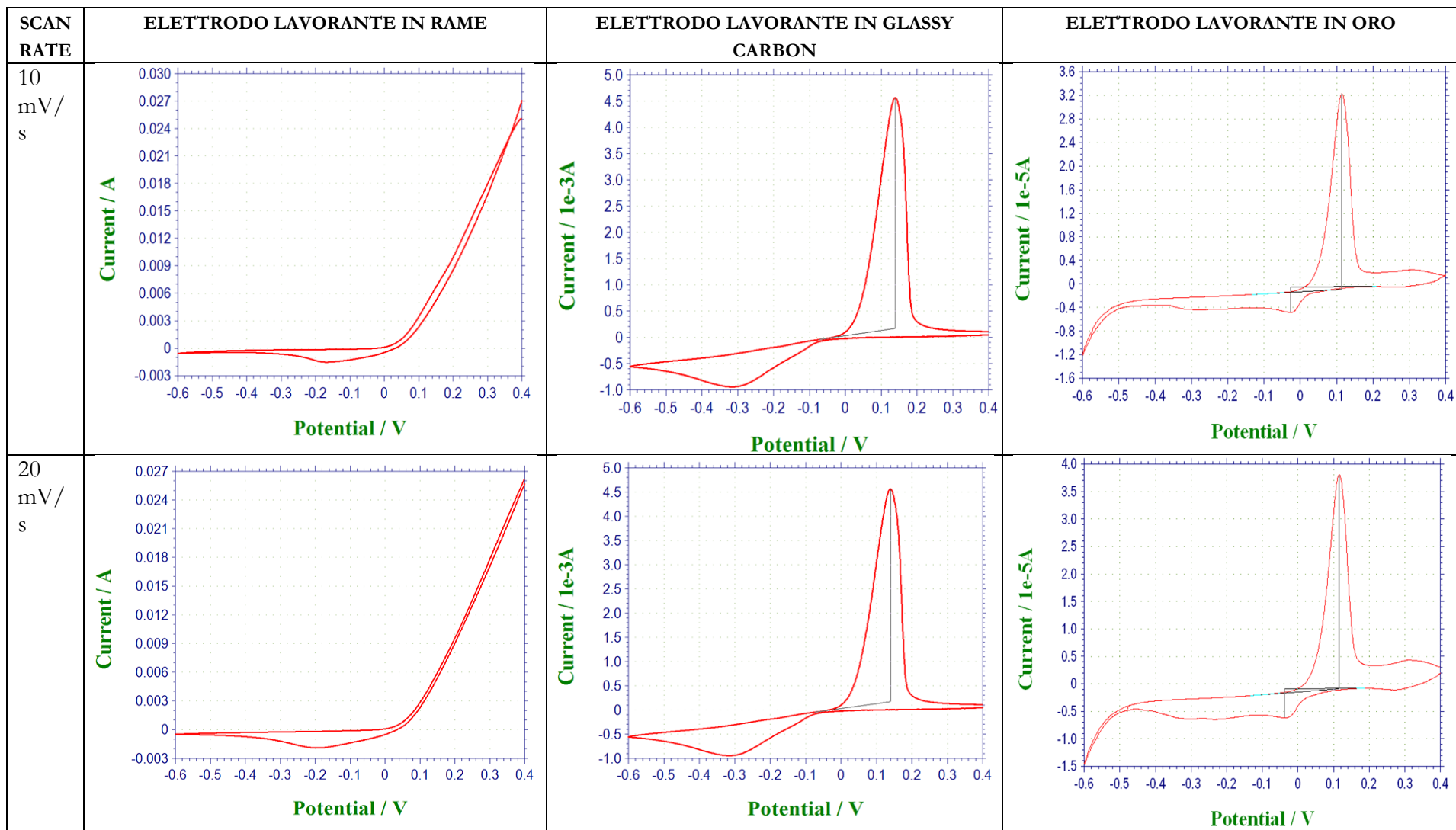
Nel caso di elettrodo in GC infatti nel ramo catodico del voltamogramma si osserva un picco diffusivo ( $E_p$  -0.3/-0.36 V vs  $\text{Cu}_{\text{ref}}$ ), mentre nel ramo anodico si individua un picco simmetrico di stripping con  $E_p \approx 0.140$  V vs  $\text{Cu}_{\text{ref}}$ . Anche in questo caso il picco catodico corrisponde alla riduzione (1), mentre quello anodico alla riossidazione del solo Cu elettrodepositato sul glassy carbon. È interessante notare come il picco di riduzione del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^0$  sul GC sia spostato a potenziali più negativi che sul rame. È noto infatti che il processo energeticamente più dispendioso in un'elettrodeposizione è la formazione dei primi nuclei

cristallini che sull'elettrodo lavorante in Cu sono già formati, mentre su un elettrodo di materiale diverso quale il glassy carbon devono essere generati durante la scansione catodica stessa.

Sull'elettrodo d'oro il quadro voltammetrico è reso più complicato dalla comparsa di nuovi picchi sia nel ramo anodico che catodico. In particolare il picco anodico a circa +0.3 V e il picco catodico a circa -0.1 V sembrano attribuibili alla formazione (ramo anodico) e alla dissoluzione (ramo catodico) di ossidi superficiali d'oro.

Dall'analisi dei voltamogrammi sopra descritti e di quelli riportati in appendice possiamo concludere che la deposizione sul Cu è facilitata e inizia a potenziali inferiori a -0.02 V vs  $\text{Cu}_{\text{ref}}$ , mentre su substrati di glassy carbon il processo comincia a potenziale minore o uguale a -0.025 vs  $\text{Cu}_{\text{ref}}$ . per accelerare a potenziali minori o uguali a -0.4 V.

Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,01 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 M e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5M





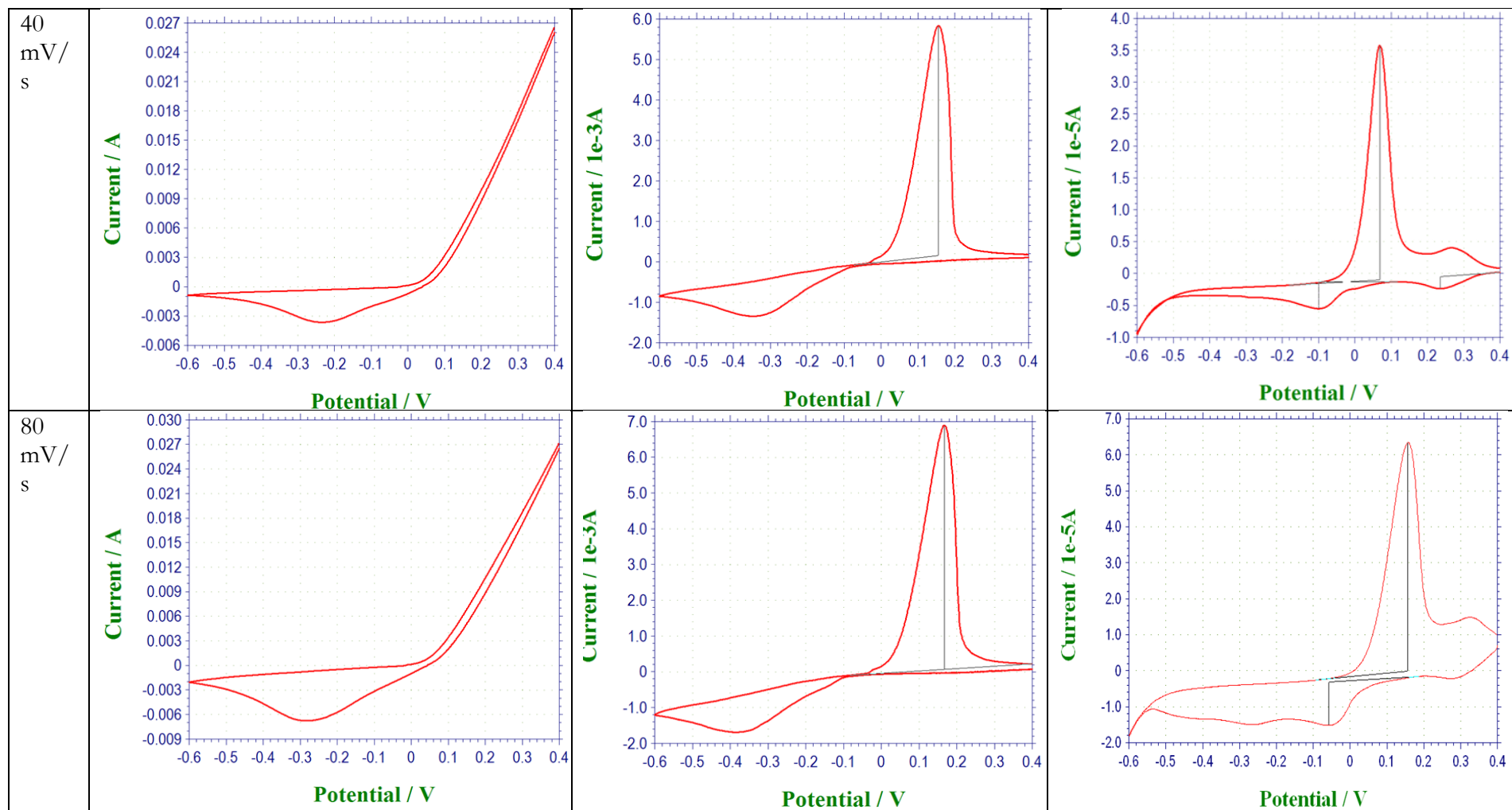

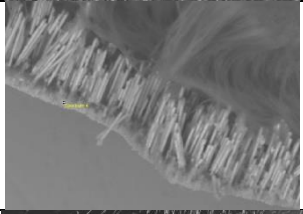
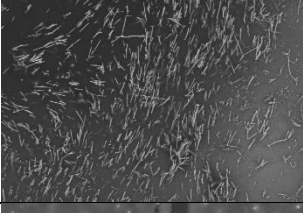
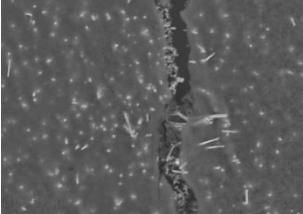


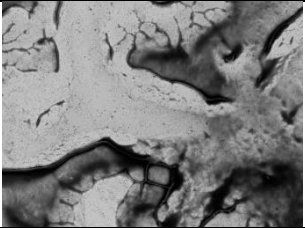
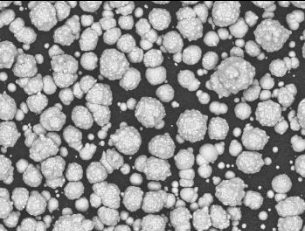
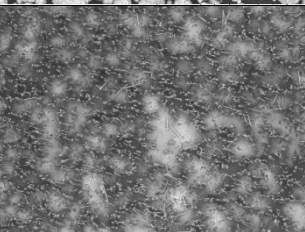
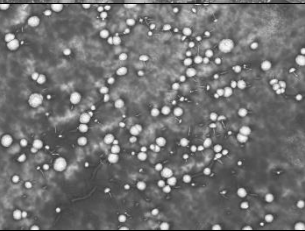
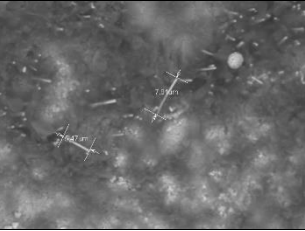
Tabella 3.1: Voltamogrammi ciclici a diverse velocità di scansione dalla soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,01 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.01 M e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M su elettrodi lavoranti in Cu, Au e GC.

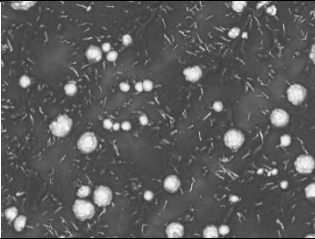
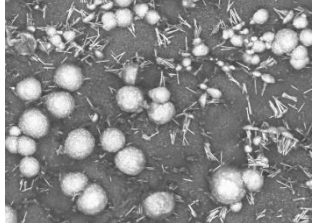

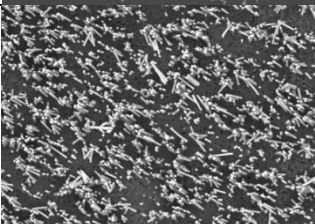
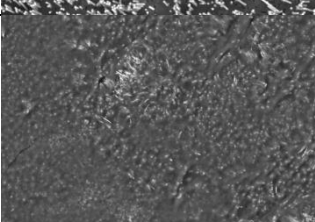
### **3.1.2.2 Ottimizzazione del sistema**

Sulla base di quanto discusso nei precedenti paragrafi, sono state condotte prove di deposizione del rame su elettrodi lavoranti in rame e glassy carbon. E' stata inoltre studiata l'influenza della composizione elettrodica e del potenziale applicato sulla formazione di nanofili in template di allumina e policarbonato, operando comunque nel range di misura suggerito dalle misure voltammetriche.

Di seguito si riporta la tabella riassuntiva di tutte le prove effettuate al fine di trovare le migliori condizioni per la deposizione dei CuNWs nelle due membrane.

MEMBRANA (materiale e porosità)	ELETTROD O	SOLUZION E	SPUTTERIN G D'ORO	TEMPO E POTENZIALE DEPOSIZION E	ETCHING	IMMAGINE AL SEM	CONSIDERAZION I
Polycarbonato , 400 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.6 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.01 M	30 secondi	10 s a -450 mV 120 s a -250 mV vs Ag/AgCl/KCl <sub>sat</sub>	Immersion e 1 minuto in DCM puro		Crescita dei CuNWs riuscita; alcune tracce di PC residue
Allumina, 200 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.6 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.01 M	30 secondi	10 s a -450 mV 300 s a -250 mV vs Ag/AgCl/KCl <sub>sat</sub>	Immersion e 5 minuti in NaOH 2 M		Crescita dei CuNWs riuscita; etching incompleto
Polycarbonato , 200 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.6 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.01 M	30 secondi	5 s a -450 mV 70 s a -250 mV vs Ag/AgCl/KCl <sub>sat</sub>	Immersion e 1 minuto in DCM puro		CuNWs cresciuti, ma più radi; ingenti residui di PC
Allumina, 200 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.6 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.01 M	30 secondi	10 s a -450 mV 400 s a -250 mV vs Ag/AgCl/KCl <sub>sat</sub>	Immersion e 15 minuti in NaOH 5 M		CuNWs cresciuti; etching più efficace sebbene ancora parziale

Allumina, 200 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.6 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.01 M	60 secondi	10 s a -450 mV 155 s a -250 mV vs Ag/AgCl/KCl <sub>sat</sub>	Immersione e 15 minuti in NaOH 5 M		Nessuna presenza di CuNWs riscontrata
Polycarbonato, 400 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	30 secondi	600 s a -400 mV vs Cu	Immersione e 1 minuto in DCM puro		Sviluppo di funghi, indice di un tempo di deposizione troppo lungo.
Polycarbonato, 400 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	30 secondi	180 s a -400 mV vs Cu	Immersione e 1 minuto in DCM puro		Crescita dei CuNWs riuscita; alcune tracce di PC residue
Polycarbonato, 400 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	30 secondi	10 s a -600 mV 170 s a -400 mV vs Cu	Immersione e 1 minuto in DCM puro		Crescita dei CuNWs con alcuni funghi; alcune tracce di PC residue
Polycarbonato, 400 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	30 secondi	90 s a -400 mV vs Cu	Immersione e 1 minuto in DCM puro		CuNWs con crescita sporadica e parziale; molte tracce di PC

Policarbonato , 400 nm	Glassy Carbon	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	30 secondi	180 s a -400 mV vs Cu	Immersion e 1 minuto in DCM puro		Crescita dei CuNWs con sviluppo di funghi; resti di PC
Policarbonato , 400 nm	Glassy Carbon	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	30 secondi	10 s a -600 mV 170 s a -400 mV vs Cu	Immersion e 1 minuto in DCM puro		Crescita CuNWs con funghi ancora più numerosi; resti di PC.
Policarbonato , 400 nm	Glassy Carbon	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	Nessuno	180 s a -400 mV vs Cu	Immersion e 1 minuto in DCM puro		Crescita di CuNWs molto radi e disomogenei
Policarbonato , 400 nm	Glassy Carbon	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	30 secondi	140 s a -400 mV vs Cu	Immersion e 1 minuto in DCM puro		CuNWs più omogenei e con meno funghi grazie al minor tempo di deposizione
Allumina, 200 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	30 secondi	600 s -400 mV vs Cu	Immersion e 15 minuti in NaOH		Crescita di CuNWs omogenei e diffusi, ma con molti resti di AAO

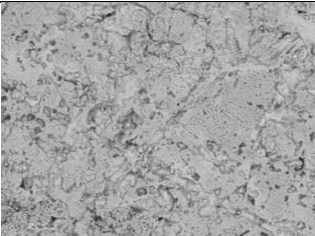
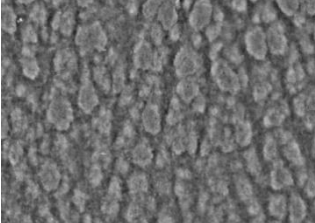
Allumina, 200 nm	Glassy Carbon	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	30 secondi	600 s a -400 mV vs Cu	Immersione e 15 minuti in NaOH		Nessuna crescita di CuNWs senza doratura
Allumina, 200 nm	Rame	CuSO <sub>4</sub> 0.3 M; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.001M; NaSO <sub>4</sub> 1 M;	Nessuno	600 s a -400 mV vs Cu	Immersione e 15 minuti in NaOH		Nessuna crescita di CuNWs senza doratura, si osserva solo membrana.

Tabella 3.2: Prove di ottimizzazione della deposizione di CuNWs effettuate.

Confrontando le informazioni ottenute a partire dalle prove di ottimizzazione effettuate, sono state tratte le seguenti conclusioni generali:

- ❖ La crescita dei nano fili in rame entro membrane di policarbonato avviene con successo sia su elettrodi di lavoro in rame che in glassy carbon, mentre nel caso dell'allumina è possibile solo sul rame.
- ❖ Per quanto riguarda il policarbonato lo sputtering di oro sul lato interno della membrana favorisce la crescita dei nanofili, ma non risulta una condizione fondamentale: le prove su glassy carbon con membrana di PC non dorata dimostrano infatti che i fili crescono lo stesso, sebbene più radi e meno omogenei. Nel caso dell'allumina in assenza di doratura non si riscontra invece alcuno sviluppo di CuNWs.
- ❖ La predeposizione di 10 secondi a potenziale fortemente riducente non risulta necessaria, in quanto porta alla formazione di un maggior numero di funghi.

### **3.1.2.2 CuNWs in policarbonato**

A fronte dei risultati ottenuti si è stabilito che le migliori condizioni di deposizione dei CuNWs in policarbonato sono le seguenti:

- Soluzione:  $\text{CuSO}_4$  0.3 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.001M e  $\text{NaSO}_4$  1 M;
- Tempo di deposizione: 180 secondi a -400 mV su elettrodo di lavoro in rame, 140 secondi su glassy carbon
- Predoratura del lato interno della membrana: 30 secondi

La deposizione dei nanofili di rame è stata effettuata mediante microscopio a scansione elettronica e sonda EDX: il SEM ha permesso di verificare l'avvenuta crescita dei CuNWs e l'efficacia dell'etching, mentre l'analisi elementare di confermare che il metallo deposto fosse rame.

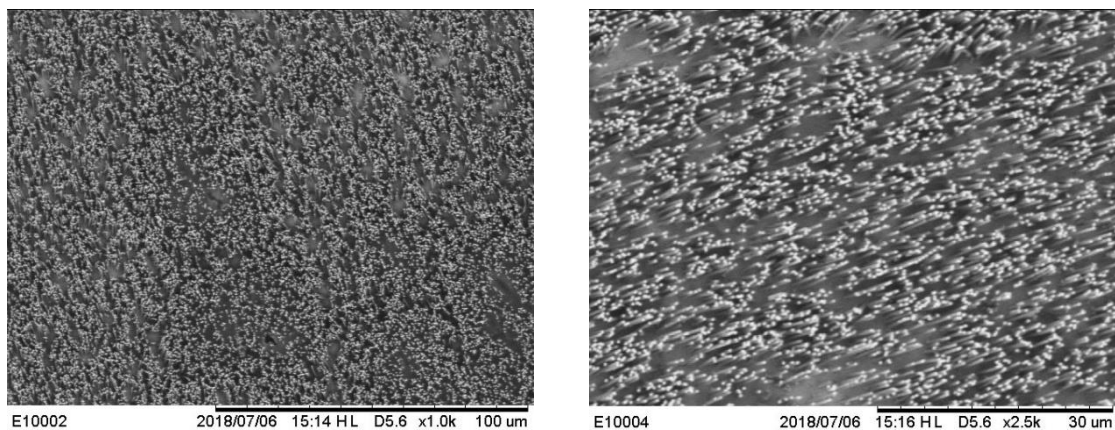


Figura 3.8: Immagini SEM di CuNWs deposti elettrochimicamente su elettrodo in rame.

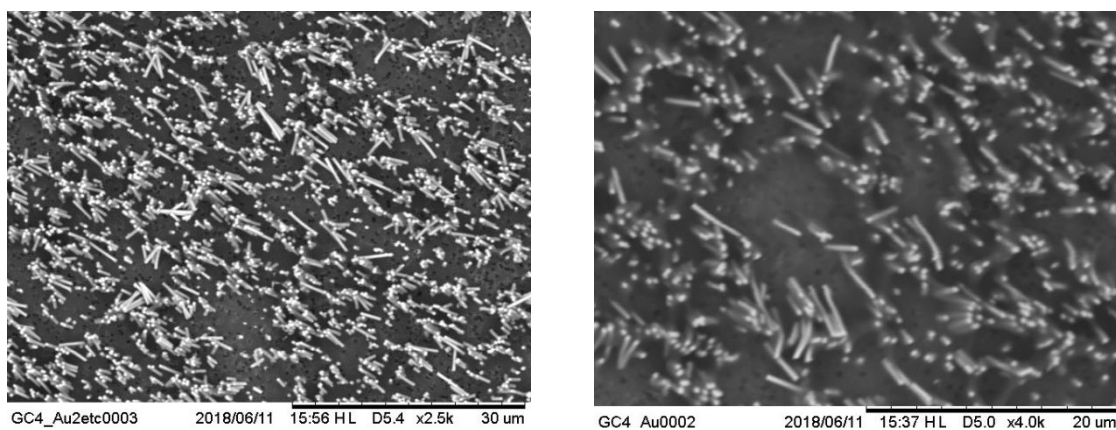


Figura 3.9: Immagini SEM di CuNWs deposti elettrochimicamente su elettrodo in glassy carbon.

Le immagini dimostrano come l'elettrodeposizione su elettrodo di lavoro in rame permetta di ottenere nanofili più densi ed omogenei rispetto al glassy carbon, dove molti pori della membrana risultano non essersi riempiti (figura 3.4). in tutti i casi lo spettro EDX ha confermato la presenza di rame, associato a carbonio ed ossigeno del policarbonato e a zolfo e fluoro del Nafion117.



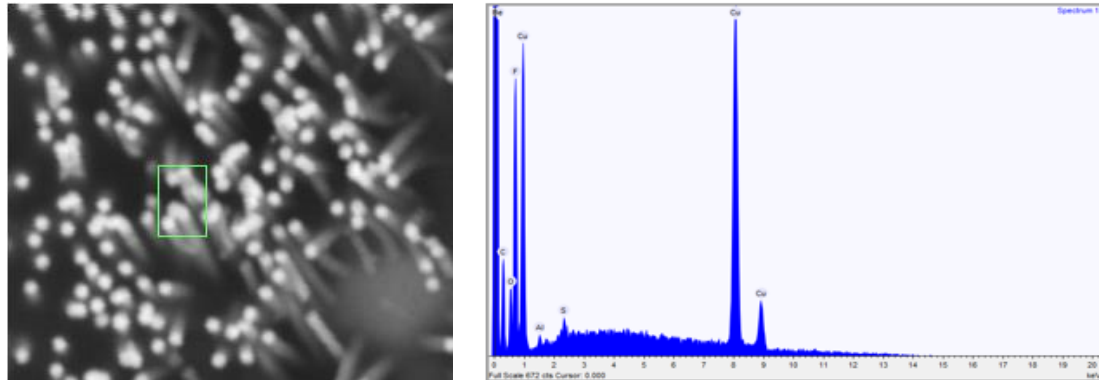


Figura 3.10: Spettro EDX acquisito dall'area indicata, corrispondente ai CuNWs.

### 3.1.2.3 CuNWs in allumina

Per quanto riguarda invece l'allumina i migliori risultati sono stati conseguiti nelle seguenti condizioni:

- Soluzione:  $\text{CuSO}_4$  0.6 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.01M
- Tempo di deposizione: 300 s a - 250 mV su elettrodo di lavoro in rame
- Predoratura del lato interno della membrana: 30 secondi

Anche in questo caso la microscopia a scansione elettronica testimonia l'avvenuta crescita dei CuNWs, mentre lo spettro elementare conferma che il metallo depositosi nei pori del *template* sia effettivamente rame.

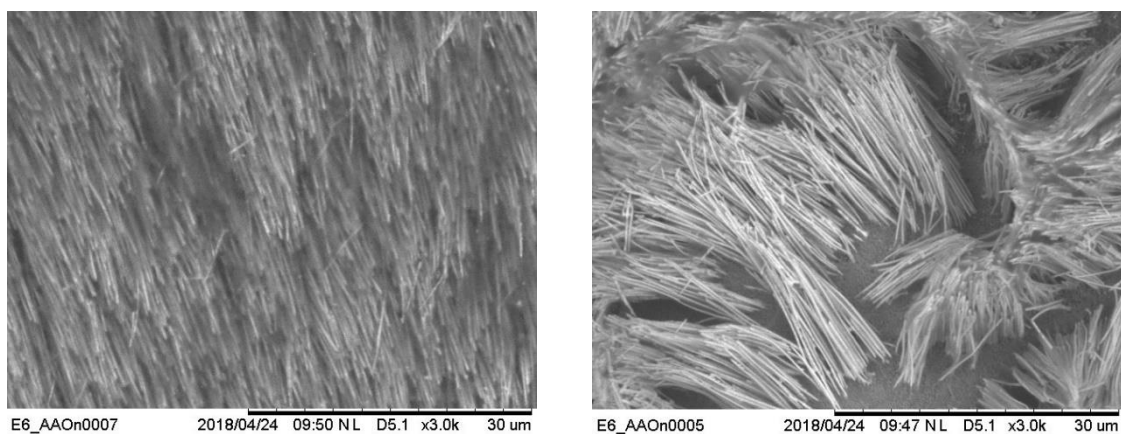


Figura 3.11: Immagini SEM di CuNWs depositi elettrochimicamente su elettrodo in rame.

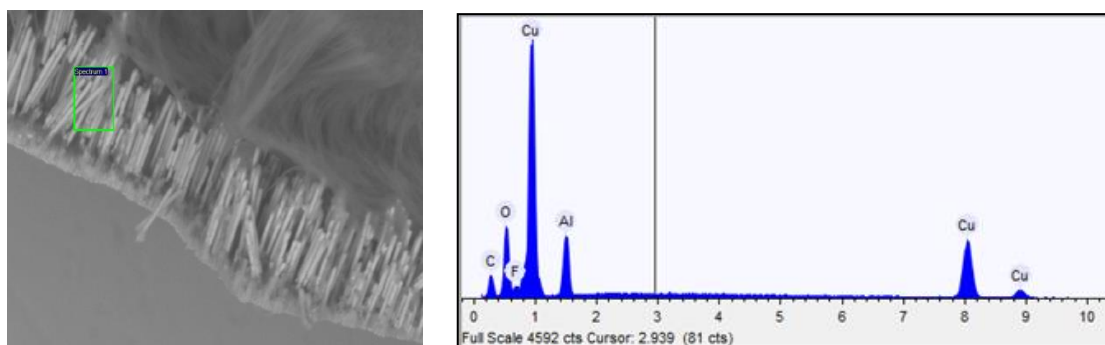


Figura 3.12: Spettro EDX acquisito dall'area indicata, corrispondente ai CuNWs.

### 3.1.3 Caratterizzazione di nanostrutture gerarchiche

Le nanostrutture gerarchiche realizzate associando le AgNSs ai nanofili d'oro o di rame mediante funzionalizzazione in cisteamina sono state caratterizzate al microscopio FE-SEM. Le immagini presentate, relative ad AuNWs, mostrano chiaramente come le nanostelle d'argento si siano fissate alla superficie dei nanofili.

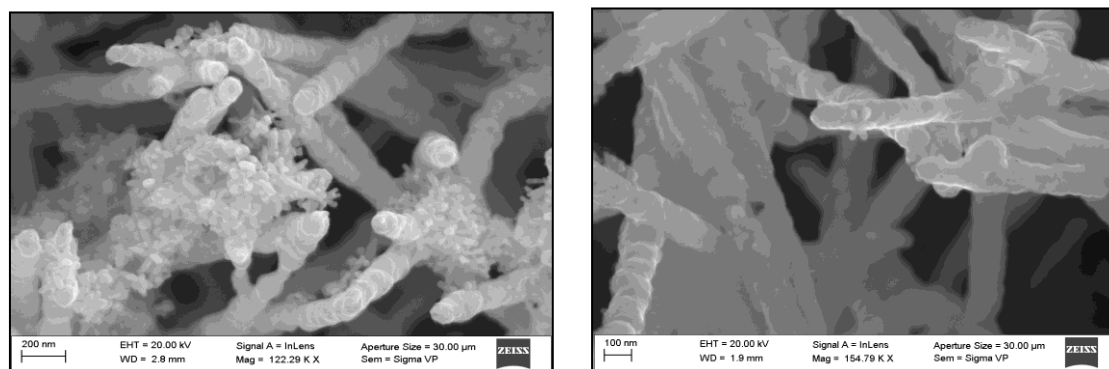


Figura 3.13: Immagini FE-SEM di AuNWs+AgNs.

## 3.2 Amplificazione Raman della sonda benzentiolo adsorbito sulle nanostrutture

### 3.2.1 Substrati SERS a base di oro

#### a. BT 10<sup>-3</sup> M

Di seguito si presentano i risultati ottenuti dalle analisi SERS del benzentiolo adsorbito da soluzioni a concentrazione 10<sup>-3</sup> M su diversi substrati a base di oro: vetrino dorato e nanofili d'oro con e senza nanostelle d'argento.

La figura 3.14 illustra gli spettri SERS ottenuti impiegando come substrato il vetrino da microscopio dorato con e senza nanostelle d'argento legate ad esso mediante funzionalizzazione in cisteammina. In assenza di nanoparticelle d'argento non è possibile distinguere alcun segnale dovuto alla diffusione Raman dell'analita: la superficie liscia e regolare del vetrino d'oro infatti, sebbene costituisca un substrato metallico, non presenta una nanostruttura che possa indurre l'*enhancement* Raman. Nel caso invece in cui il colloide d'argento venga legato alla superficie, diventa possibile distinguere alcuni segnali ascrivibili al benzentiolo, nonostante il back-ground di fluorescenza ed un rumore di fondo piuttosto consistente nascondano parzialmente le bande. In particolare si riconoscono chiaramente il segnale a 237 cm<sup>-1</sup> dovuto alle nanostelle d'argento come indicato in letteratura da Sanchez-Cortés (Sanchez-Cortés et Garcia-ramos, 1998) e quattro dei principali picchi del benzentiolo, a 996, 1024, 1076 generati dalle vibrazioni dell'anello e a 1575 cm<sup>-1</sup> dallo stretching del gruppo C-S e C-C. Per gli spettri Raman di riferimento tratti dalla letteratura del colloide d'argento e del benzentiolo si rimanda all'appendice C.

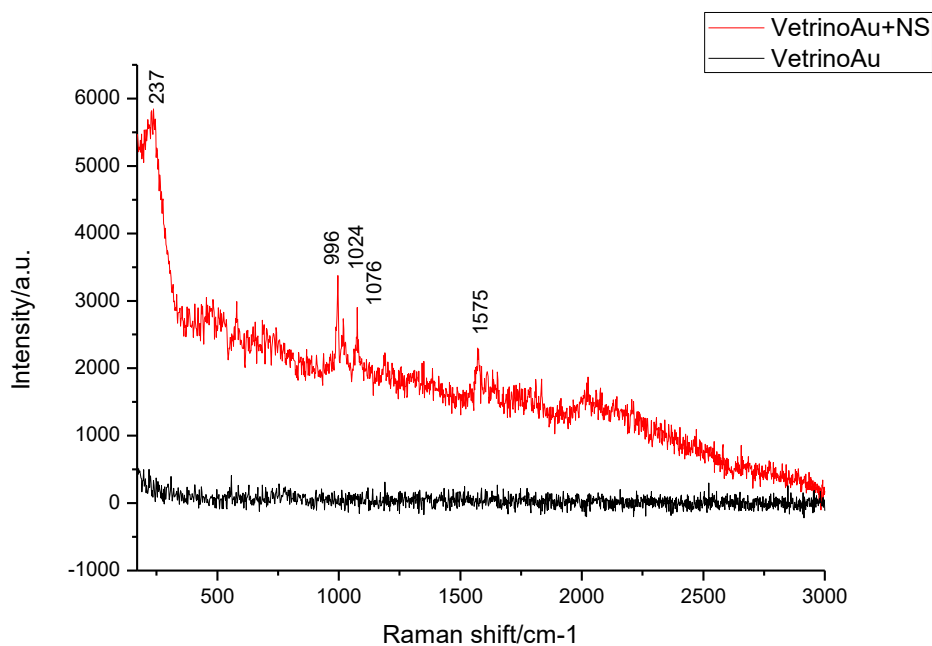


Figura 3.14: Spettri SERS di benzoinolo  $10^{-3}$  M misurati su vetrino dorato con o senza AgNSs.

La figura 3.15 riporta gli spettri acquisiti impiegando invece come substrato i nanofili d'oro con e senza nanostelle d'argento. In entrambi i casi è possibile riconoscere lo spettro Raman del benzoinolo: gli AuNWs costituiscono già di per sé un nanomateriale, pertanto anche in assenza di AgNSs danno luogo ad un *enhancement* della diffusione Raman. Il confronto fra gli spettri mostra che i picchi cadono nella medesima posizione, ma nel caso di AuNWs+AgNSs risultano molto più definiti ed intensi. In particolare si osservano il picco del colloide a  $225\text{ cm}^{-1}$ , leggermente shiftato a numeri d'onda inferiori per effetto della compresenza con l'oro, ed i picchi del benzoinolo, di cui rispetto al caso precedente (vetrino dorato + AgNSs) si distinguono un maggior numero di segnali.

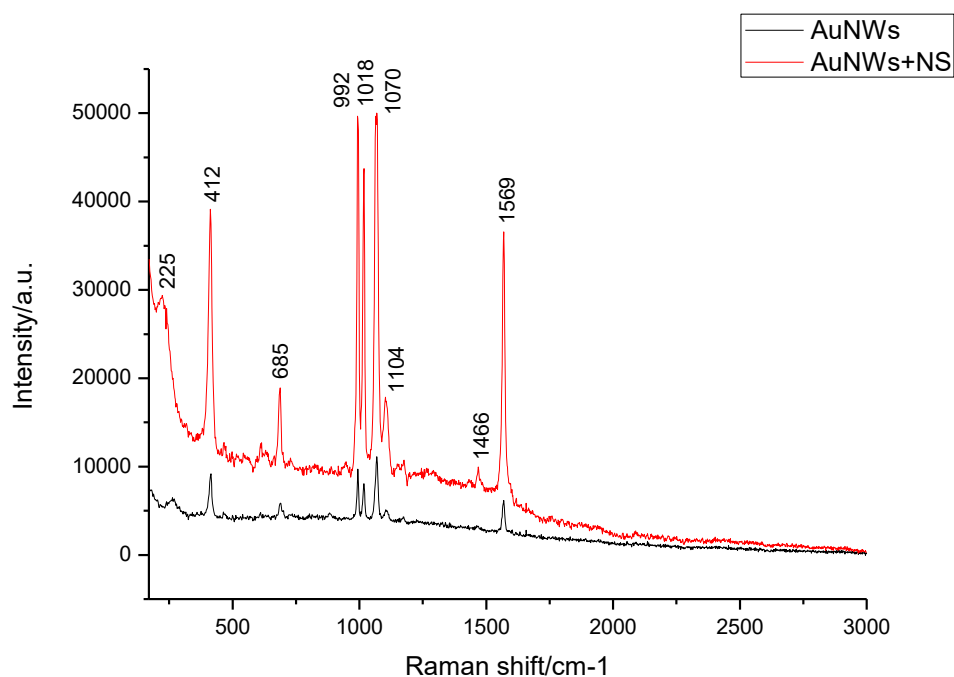


Figura 3.15: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-3}$  M misurati su AuNWs con o senza AgNSs.

A seguire si riporta una tabella riassuntiva dei segnali SERS ottenuti per il benzentiolo  $10^{-3}$  M sui vari substrati, con la rispettiva assegnazione e confrontati con quelli riportati in letteratura (Fontana et al., 2013; Zamuner et al., 2009; Mcfarland et al., 2005).

Letteratura	Vetrino Au	Vetrino Au+NS	AuNWs	AuNWs+NS	Assegnazione
420	-	-	412 m	412 s	$\nu(\text{C-S})$ /ring in-plane deformation
690	-	-	685 w	685 m	Ring in-plane deformation/ $\nu(\text{C-S})$
998	-	996 m	992 m	992 s	Ring out-of-plane deformation/ $\gamma(\text{C-H})$
1022	-	1024 w	1018 m	1018 s	Ring in-plane deformation/ $\nu(\text{C-C})$

1072	-	1076 m	1070 m	1070 s	$\nu(\text{C-C})/\nu(\text{C-S})$
1111	-	1575 w	1104	1104 m	Vibrazioni dell'anello/ $\nu(\text{C-S})$
1472	-	-	-	1466 w	-
1571	-	-	1569 m	1569 s	$\nu(\text{C-C})/\nu(\text{C-S})$
		237 s	262 m	225 s	NPs

Tabella 3.3: Confronto fra la posizione delle bande (in  $\text{cm}^{-1}$ ) del benzotriolo riportate in letteratura con la loro assegnazione e quelle ottenute sperimentalmente sui vari substrati. Nella descrizione relativa dell'intensità delle bande: sh= shoulder, w= weak, m= medium e s= strong.

#### b. BT $10^{-5}$ M

Per studiare la possibile influenza della concentrazione superficiale di benzotriolo adsorbito, che ragionevolmente dipende dalla concentrazione in soluzione (ad esempio se l'adsorbimento segue un'isoterma di Langmuir), sono state effettuate analisi SERS sui medesimi substrati, ma adsorbendo BT da una soluzione a concentrazione inferiore:  $10^{-5}$  M.

Gli spettri SERS in figura 3.16 sono stati innanzitutto acquisiti impiegando come substrato il vetrino dorato con e senza nanostelle. In assenza del colloide lo spettro conferma l'impossibilità di rivelare alcun segnale, mentre le AgNSs permettono di riconoscere, nonostante la molto debole intensità, i tre picchi più importanti del benzotriolo a 992, 1018 e  $1074 \text{ cm}^{-1}$  (riquadro blu in figura). Compaiono inoltre il picco del colloide a  $225 \text{ cm}^{-1}$  e due nuovi, rispettivamente a 640 e  $720 \text{ cm}^{-1}$ , attribuibili alla cisteamina (Ma et al., 2016). La loro comparsa, non riscontrata nelle misure effettuate sul benzotriolo  $10^{-3}$  M, è dovuta alla diminuzione della concentrazione dell'analita di due ordini di grandezza, cui consegue una diminuzione di intensità del segnale, il quale non risulta più sufficiente a coprire quelli della cisteamina usata per legare le nanoparticelle alla superficie d'oro.

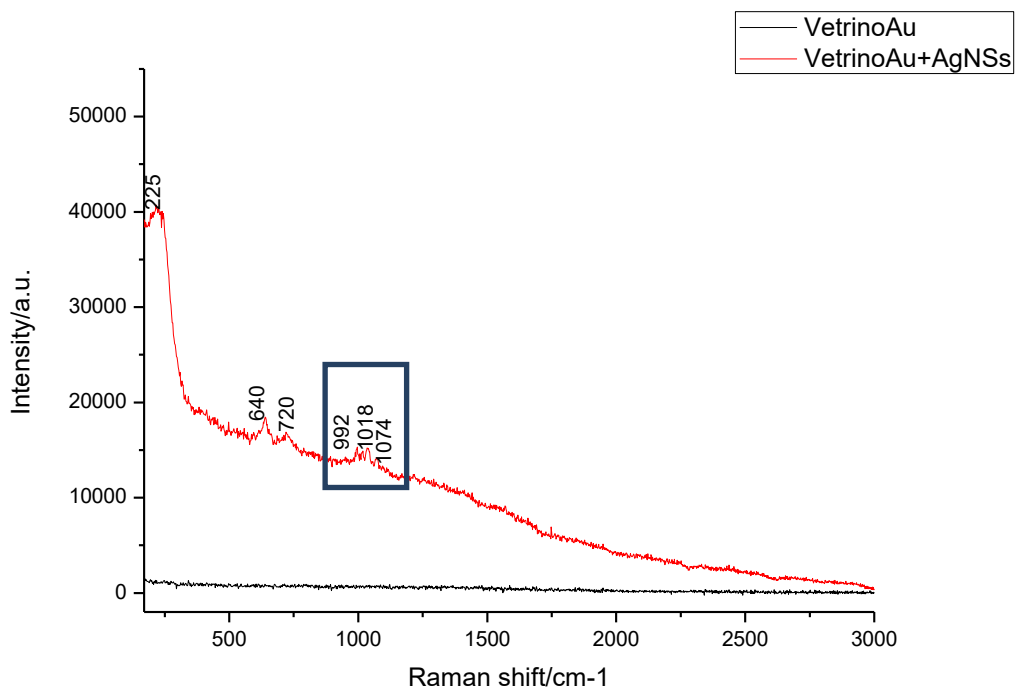


Figura 3.16: Spettri SERS di benzoinolo  $10^{-5}$  M misurati su vetrino dorato con o senza AgNSs.

Anche le analisi effettuate usando come substrato di base i nanofili d'oro (AuNWs) portano a risultati in accordo con i precedenti: il confronto fra gli spettri SERS acquisiti con o senza nanostelle d'argento (Fig. 3.17) mostra infatti come in entrambi i casi sia possibile l'identificazione, che risulta tuttavia molto più agevole nel caso del sistema gerarchico. Lo spettro ottenuto coi soli AuNWs presenta, seppur appena riconoscibili, i picchi tipici del benzoinolo, quello dei nanofili, leggermente shiftato a numeri d'onda inferiori rispetto a quello delle nanoparticelle d'argento, ed un ultimo picco probabilmente dovuto alla cisteammina. In presenza di nanostelle i segnali che si registrano risultano invece molto più intensi e definiti, nonostante un considerevole rumore di fondo. Fra 500 e 700  $\text{cm}^{-1}$  compare inoltre un gruppo di segnali finora mai riscontrati, probabilmente dovuti ad impurezze.

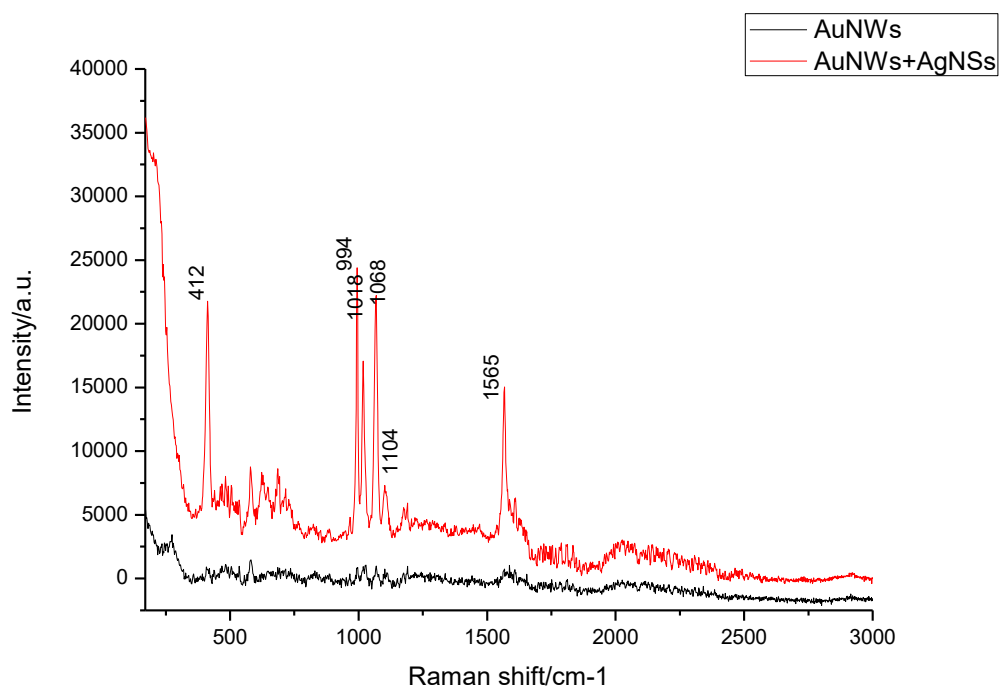


Figura 3.17: Spettri SERS di benzotriolo  $10^{-5}$  M misurati su AuNWs con o senza AgNSs.

A seguire si riporta una tabella riassuntiva dei segnali SERS ottenuti per il benzotriolo  $10^{-5}$  M sui vari substrati, con la rispettiva assegnazione e confrontati con quelli riportati in letteratura (Zamuner et al., 2009).

Letteratura	Vetrino Au	Vetrino Au+NSs	AuNWs	AuNWs+NSs	Assegnazione
420	-	-	-	412 s	$\nu(\text{C-S})$ /ring in-plane deformation
998	-	992 w	994 w	994 s	Ring out-of-plane deformation/ $\gamma(\text{C-H})$
1022	-	1018 w	1018 w	1018 s	Ring in-plane deformation/ $\nu(\text{C-C})$
1072	-	1074 w	1068 w	1068 s	$\nu(\text{C-C})/\nu(\text{C-S})$
1111	-	-	-	1104 m	Vibrazioni dell'anello/ $\nu(\text{C-S})$
1472	-	-	-	-	-



1571	-	-	1565 w	1565 s	$\nu(\text{C-C}) / \nu(\text{C-S})$
	-	225 s	264 s	197 s	NPs

Tabella 3.4: Confronto fra la posizione delle bande (in  $\text{cm}^{-1}$ ) del benzentiolo riportate in letteratura con la loro assegnazione e quelle ottenute sperimentalmente sui vari substrati. Nella descrizione relativa dell'intensità delle bande: sh= shoulder, w= weak, m= medium e s= strong.

### c. BT $10^{-6}$ M

Visti i risultati positivi relativi alla possibilità di identificare il benzentiolo anche a partire da soluzioni a concentrazione  $10^{-5}$  M, si è voluto verificare se fosse possibile estendere il limite di rivelabilità ad una concentrazione ancora più bassa:  $10^{-6}$  M.

La figura 3.18 mostra come, utilizzando come substrato di base il vetrino dorato, anche in presenza di AgNSs, non sia possibile riconoscere nello spettro alcun segnale del benzentiolo, la cui concentrazione risulta troppo bassa per rivelarlo. L'unica differenza fra i due spettri è che quello acquisito su AgNSs presenta un'intensificazione del segnale intorno ai  $200 \text{ cm}^{-1}$  dovuta al colloide stesso.

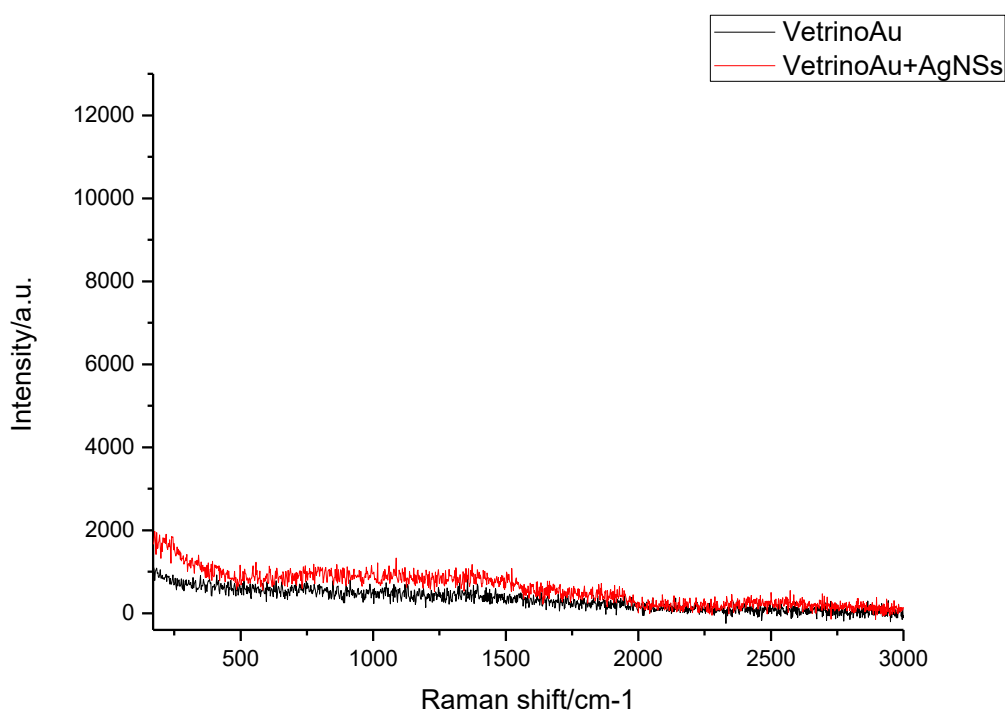


Figura 3.18: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-6}$  M misurati su vetrino dorato con o senza AgNSs.

Gli AuNWs, sia da soli che soprattutto se associati alle nanostelle, portano invece ad ottenere spettri leggermente migliori (Fig. 3.19): si distinguono chiaramente i picchi dei nanomateriali, più shiftati verso numeri d'onda maggiori in caso di AgNSs, e il rumore di fondo risulta inferiore. In presenza del colloide d'argento è inoltre possibile riconoscere i picchi della cisteamina a 631 e 720  $\text{cm}^{-1}$ . Anche in questo caso la concentrazione di benzentiolo si è rivelata tuttavia troppo bassa per poterlo identificare.

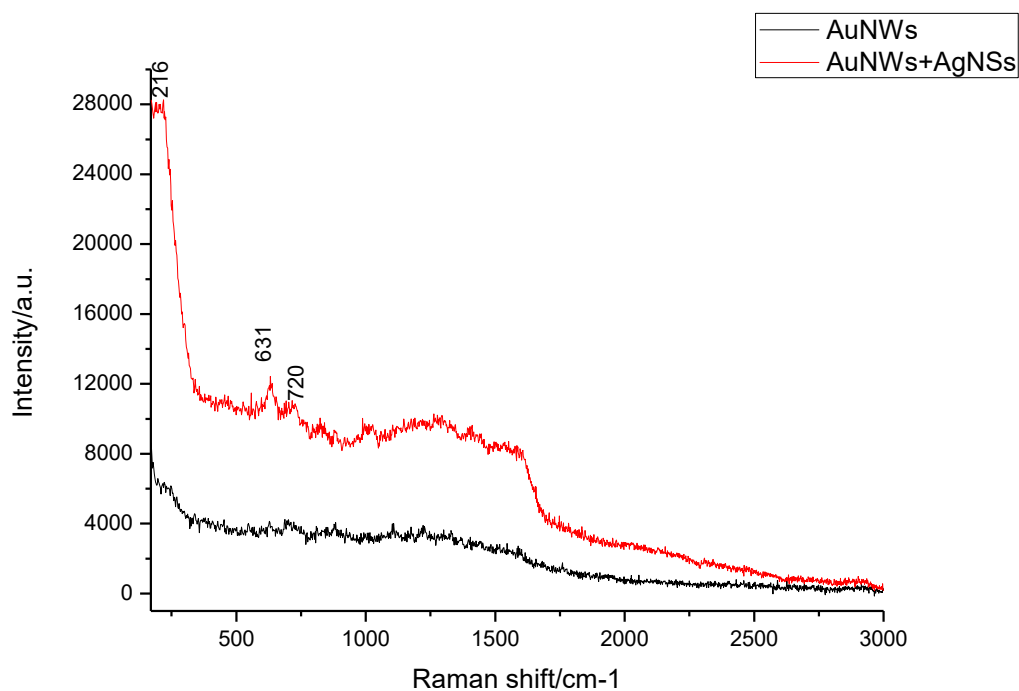


Figura 3.19: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-6}$  M misurati su AuNWs con o senza AgNSs.

### 3.2.2 Substrati SERS a base di rame

Le stesse analisi SERS effettuate utilizzando come substrato di base l'oro sono state eseguite impiegando il rame in modo da poter confrontare tra loro le prestazioni dei due metalli. Di seguito si riportano i risultati ottenuti per il benzentiolo alle tre diverse concentrazioni sui diversi substrati: lastrina e nanofili in rame con o senza nanostelle d'argento.

### a. BT $10^{-3}$ M

La figura 3.20 illustra gli spettri SERS ottenuti dall'analisi del benzentiolo adsorbito da soluzioni a concentrazione  $10^{-3}$  M impiegando come substrato una lastrina di rame con e senza nanostelle d'argento. Anche in questo caso in assenza di nanoparticelle non è possibile distinguere alcun segnale Raman dell'analita a causa della mancanza di un substrato nanostrutturato. Si osserva inoltre che il picco del colloide, la cui presenza è indicata dall'andamento crescente dello spettro, per effetto della compresenza col rame si sposta a numeri d'onda inferiori ( $\approx 180 \text{ cm}^{-1}$ ).

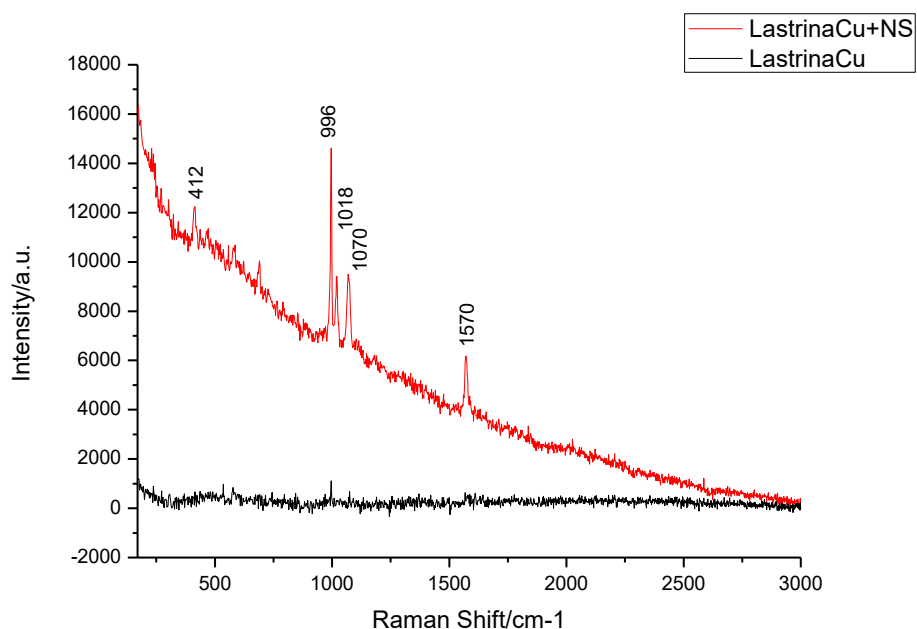


Figura 3.20: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-3}$  M misurati su lastrina di rame con o senza AgNSs.

Anche le analisi effettuate utilizzando come substrato di base i nanofili di rame hanno portato a risultati simili a quelli ottenuti per l'oro: in entrambi i casi si riconoscono le bande Raman del benzentiolo, più intense in presenza del colloide di argento (Fig. 3.21).

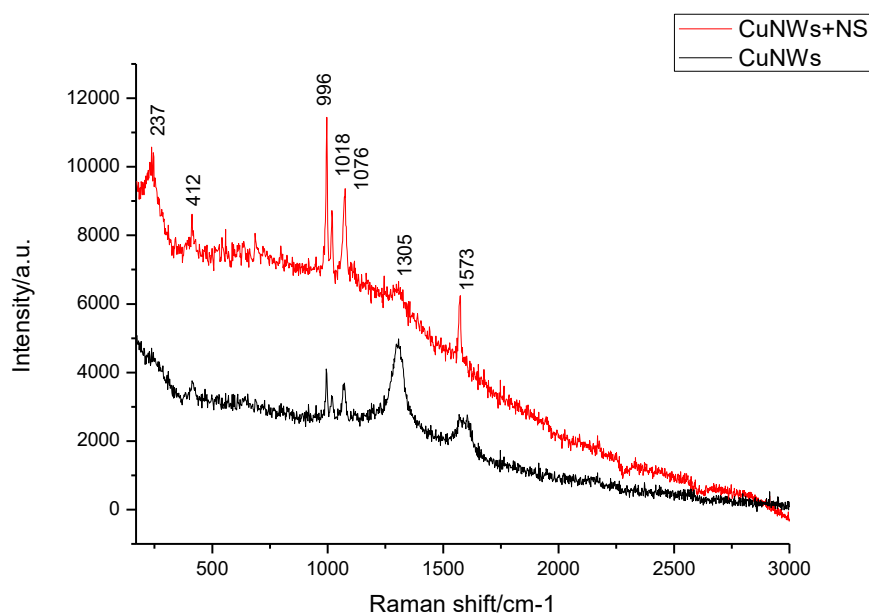


Figura 3.21: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-3}$  M misurati su lastrina di rame con o senza AgNSs.

A seguire si riporta una tabella riassuntiva dei segnali SERS ottenuti per il benzentiolo  $10^{-3}$  M sui vari substrati in rame, con la rispettiva assegnazione e confrontati con quelli riportati in letteratura (Fontana et al., 2013; Zamuner et al., 2009; Mcfarland et al., 2005).

Letteratura	Lastrina Cu	Lastrina Cu+NSs	CuNWs	CuNWs+NSs	Assegnazione
420	-		412 w	412 w	$\nu(\text{C-S})$ /ring in-plane deformation
998	-	996 s	996 m	996 s	Ring out-of-plane deformation/ $\gamma(\text{C-H})$
1022	-	1018 m	1018 w	1018 m	Ring in-plane deformation/ $\nu(\text{C-C})$
1072	-	1070 s	1076 m	1076 s	$\nu(\text{C-C})/\nu(\text{C-S})$
-	-	-	1305 vs	1305 w	-
1571	-	1570 m	1573 br	1573 s	$\nu(\text{C-C})/\nu(\text{C-S})$
	-	180 s	180 s	237 s	NPs

Tabella 3.5: Confronto fra la posizione delle bande (in  $\text{cm}^{-1}$ ) del benzentiolo riportate in letteratura con la loro assegnazione e quelle ottenute sperimentalmente sui vari substrati. Nella descrizione relativa dell'intensità delle bande: sh= shoulder, w= weak, m= medium e s= strong.

### b. BT $10^{-5}$ M

Le analisi effettuate adsorbendo il benzenotolo sui substrati in rame da soluzioni a concentrazione  $10^{-5}$  M non hanno permesso in nessun caso l'identificazione univoca dell'analita.

Come si osserva in figura 3.22, anche in presenza del colloide, sulla lastrina di rame si può osservare soltanto un accenno dei picchi principali del BT tra  $900$  e  $1100$   $\text{cm}^{-1}$  (riquadro in figura), in gran parte coperti dall'elevato segnale di fluorescenza in sottofondo. Compaiono inoltre picchi non identificabili dovuti ad impurezze.

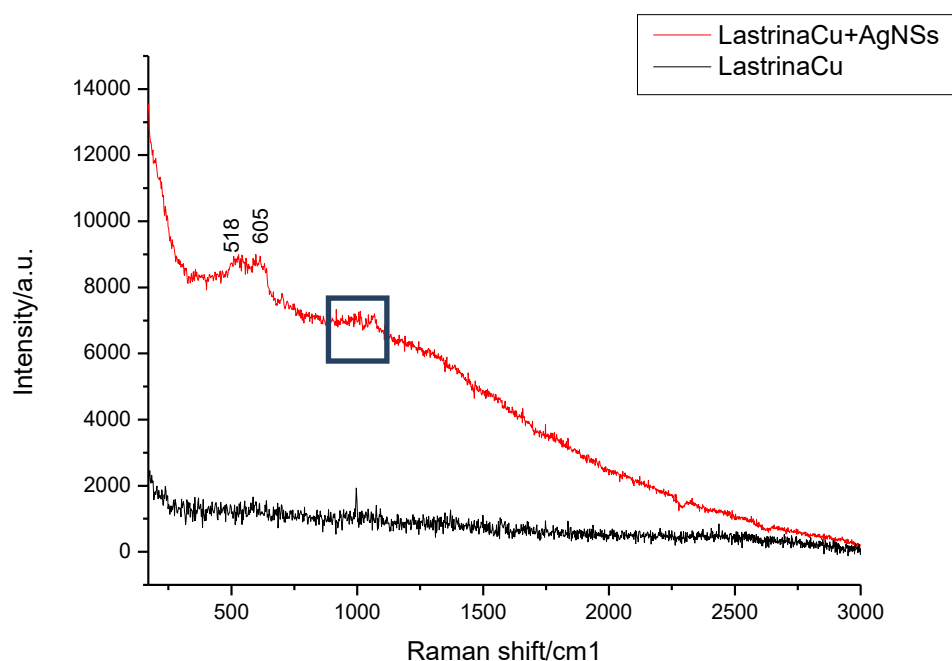


Figura 3.22: Spettri SERS di benzenotolo  $10^{-5}$  M misurati su lastrina di rame con o senza AgNSs.

Per analizzare il benzenotolo  $10^{-5}$  M su CuNWs, sono stati sperimentati come substrato SERS nanofili di rame ottenuti per deposizione elettrochimica su due diversi elettrodi di lavoro: in rame ed in glassy carbon. Obiettivo del confronto è comprendere se ci siano delle differenze e un materiale possa favorire l'analisi SERS più dell'altro.

Nel caso di CuNWs su glassy carbon (Fig. 3.23) si riconoscono appena accennati i tre picchi principali del benzenotolo, associati al picco del colloide e a quello della cisteammmina, distinguibile a causa della bassa concentrazione dell'analita. Impiegando invece elettrodi di lavoro in rame, il risultato è stato ancora peggiore: gli spettri SERS non recano traccia

dell'analita, ma soltanto alcuni deboli picchi generati dalla cisteammina e da impurezze (Fig. 3.24).

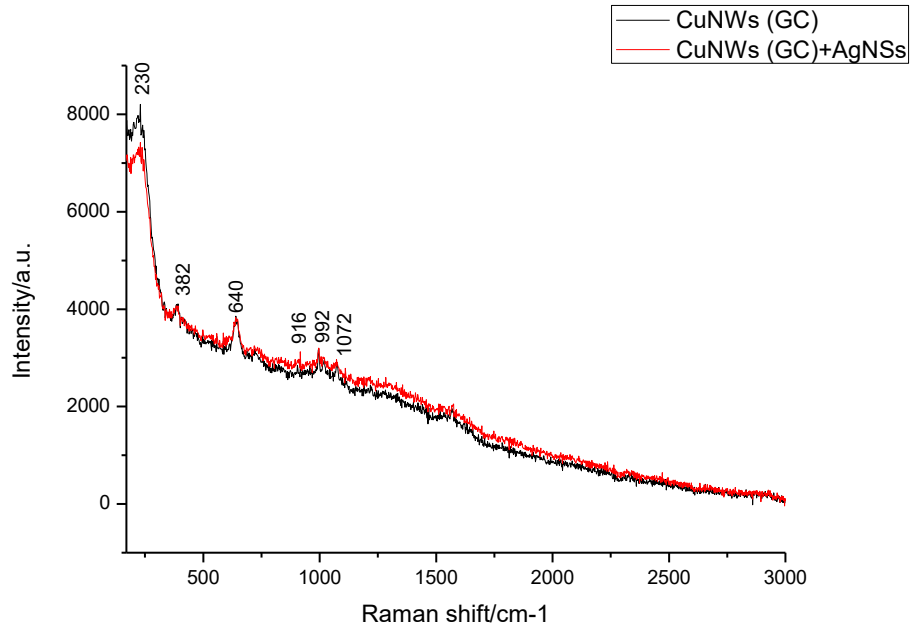


Figura 3.23: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-5}$  M misurati su CuNWs (su glassy carbon) con o senza AgNSs.

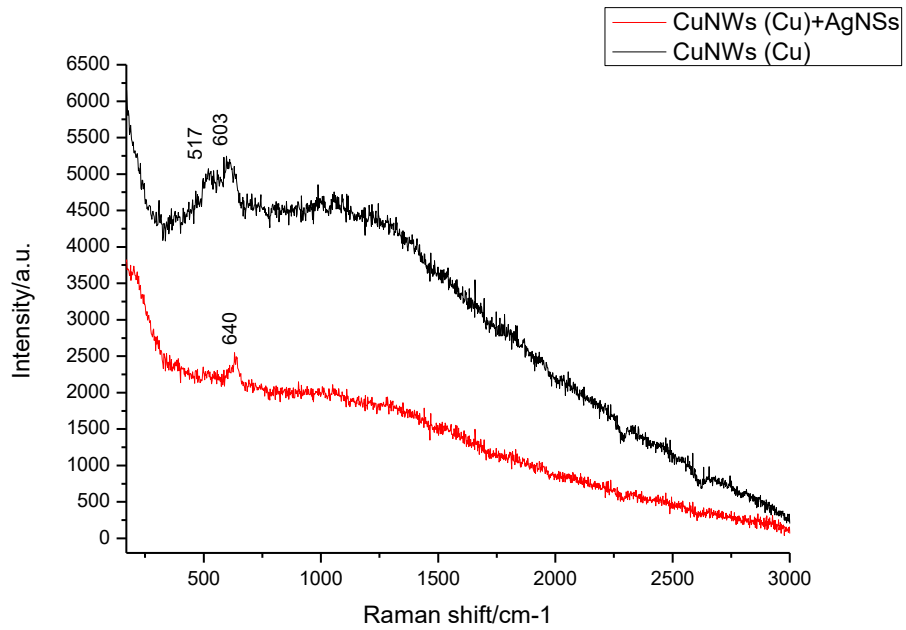


Figura 3.24: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-5}$  M misurati su CuNWs (su rame) con o senza AgNSs.

c. BT  $10^{-6}$  M

Come già osservato per i substrati d'oro, il benzentiolo adsorbito da soluzioni a concentrazione  $10^{-6}$  M risulta sotto al limite di rivelabilità del sistema. Non è infatti possibile riconoscerne i segnali né acquisendo lo spettro sulla lastrina in rame (Fig. 3.25) né sui CuNWs (Figg. 3.26 e 3.27), nemmeno se presenti le nanostelle d'argento. Gli unici picchi appena distinguibili dall'intenso back-ground di fluorescenza sono in tutti i casi attribuibili alla cisteammina e ad impurezze.

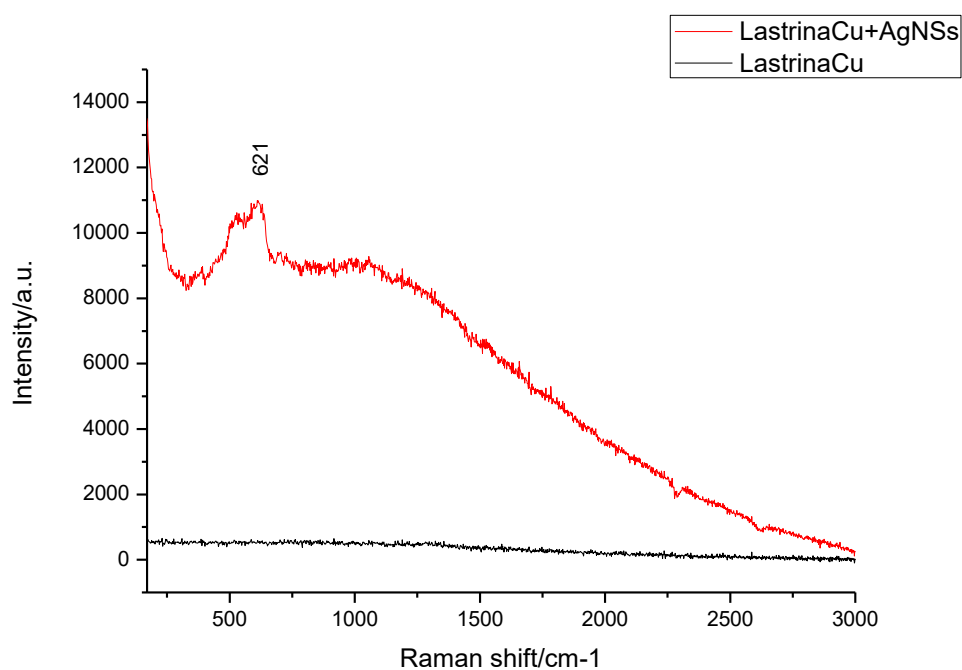


Figura 3.25: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-6}$  M misurati su lastrina di rame con o senza AgNSs.

L'elettrodeposizione dei CuNWs su elettrodo lavorante in glassy carbon piuttosto che in rame non ha portato a sostanziali differenze.

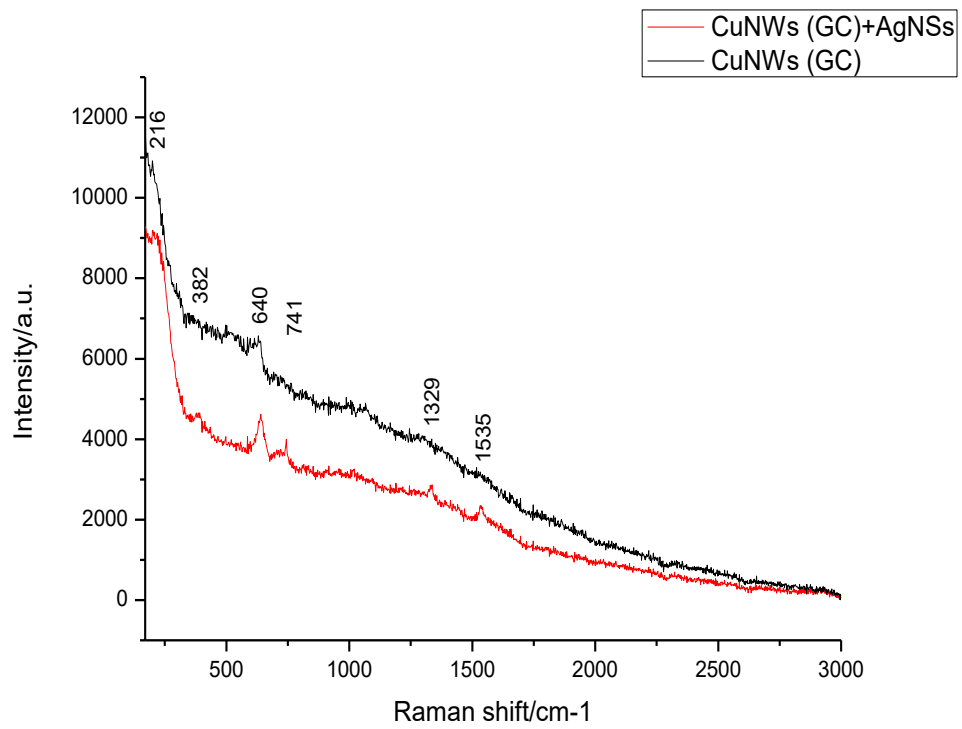


Figura 3.26: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-6}$  M misurati su CuNWs (su glassy carbon) con o senza AgNSs.

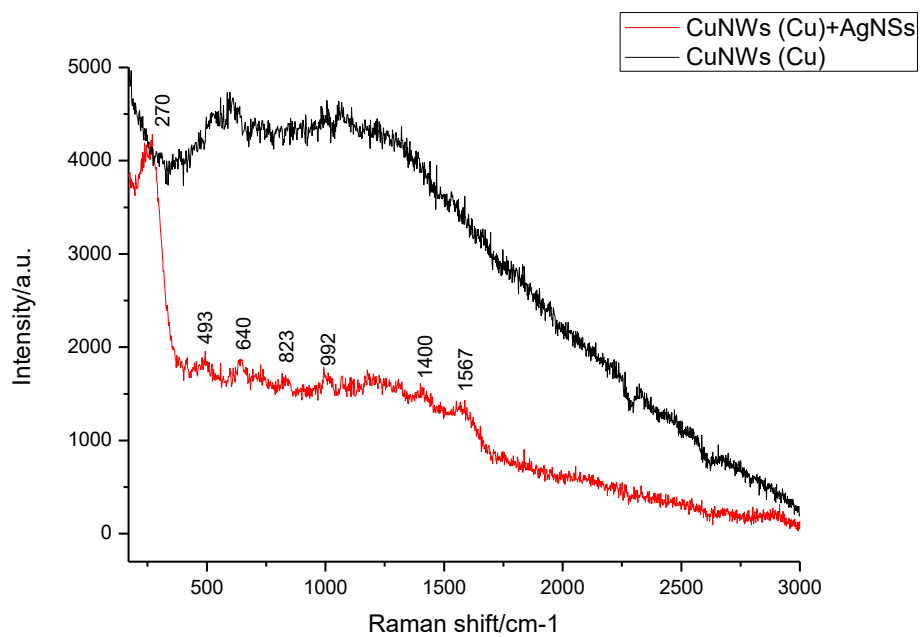


Figura 3.27: Spettri SERS di benzentiolo  $10^{-6}$  M misurati su CuNWs (su rame) con o senza AgNSs.



### 3.2.3 Discussione dei risultati per il BT

I risultati ottenuti e presentati nei paragrafi precedenti sono dunque stati comparati ed interpretati per poter giungere a delle conclusioni.

Quanto al benzenziolo a concentrazione  $10^{-3}$  M, è stato possibile ottenere il suo spettro con tutti i substrati in oro e rame sperimentati, ad eccezione che per il solo vetrino dorato o la sola lastrina di rame. Questi ultimi infatti, sebbene costituiscano dei substrati metallici, non presentano una nanostruttura che possa indurre l'effetto SERS ed il conseguente amplificazione del segnale Raman dell'analita ad essi adsorbito. Andando a depositare sulla superficie metallica il colloide d'argento, diventa invece possibile identificare il benzenziolo: le nanostelle interagiscono infatti con le sue molecole amplificandone il segnale di diffusione Raman. Una considerazione analoga può essere estesa anche nel caso in cui la misura venga eseguita sui soli nanofili: dal momento che già di per sé costituiscono un nanomateriale, essi sono in grado di indurre l'effetto SERS e conseguentemente permettono di riconoscere nello spettro la presenza del benzenziolo. Andando infine ad associare nanofili e nanostelle d'argento, si ottiene un sistema gerarchico composto da due nanostrutture. Quest'ultimo si dimostra di gran lunga il substrato SERS migliore, portando ad avere picchi ben definiti e di grande intensità. Il sistema gerarchico NWs+NSs porta dunque ad ottenere il miglior *enhancement* del segnale Raman.

Le considerazioni fatte trovano conferma nel confronto fra gli spettri acquisiti sui diversi substrati, illustrato rispettivamente per l'oro e per il rame in figura 3.28 e 3.29.

La figura 3.28 mostra come lo spettro acquisito sul solo vetrino d'oro non presenti alcun segnale, mentre depositandovi sopra le nanostelle d'argento i principali picchi del benzentiolo comincino a diventare distinguibili. Anche gli AuNWs da soli permettono di riconoscere la presenza dell'analita, ma quando vengono associati alle nanostelle lo spettro che si ottiene risulta nettamente migliore.

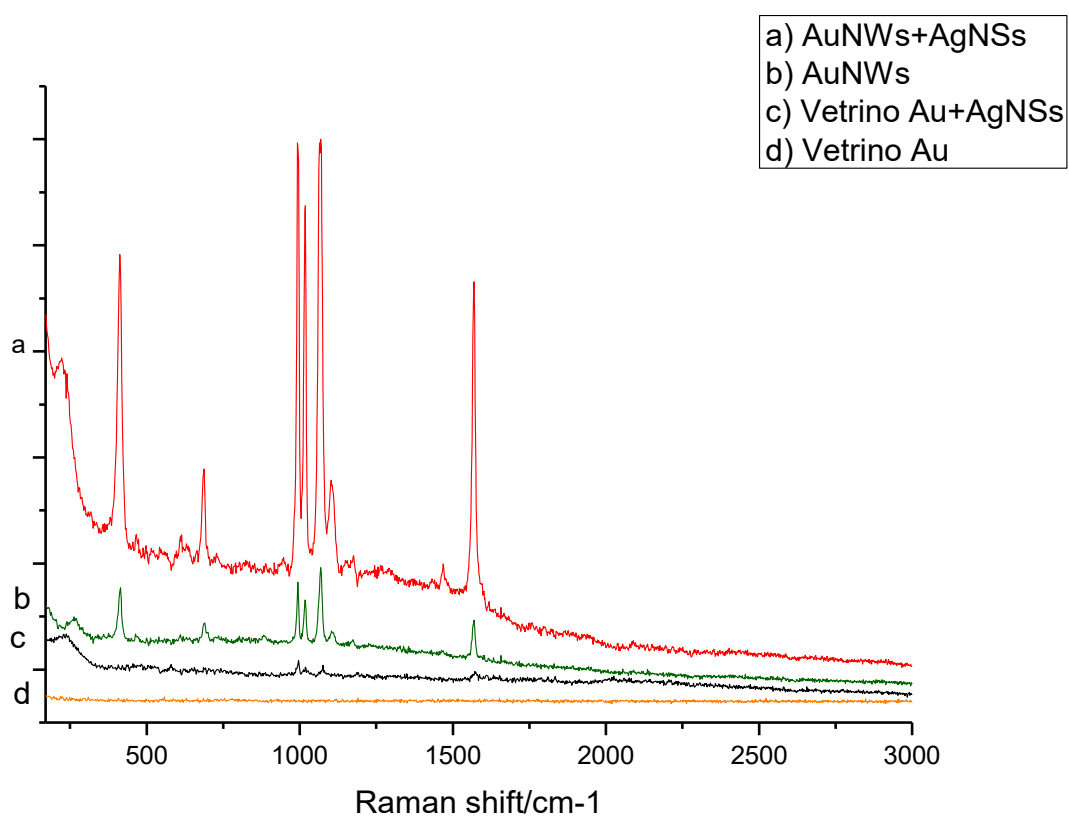


Figura 3.28: Confronto fra gli spettri del benzentiolo  $10^{-3}$  M acquisiti sui quattro substrati a base di oro.

La figura 3.29 mostra lo stesso confronto eseguito per il rame: sulla sola lastrina non si osserva alcun segnale utile, ma depositandovi le nanostelle compaiono i picchi del benzentiolo. Anche i nanofili di rame da soli inducono l'effetto SERS, ma il risultato migliore si ha ancora associando fra loro le due nanostrutture, anche se in questo caso l'effetto dell'associazione risulta meno marcato che per il sistema Au-AgNSs.

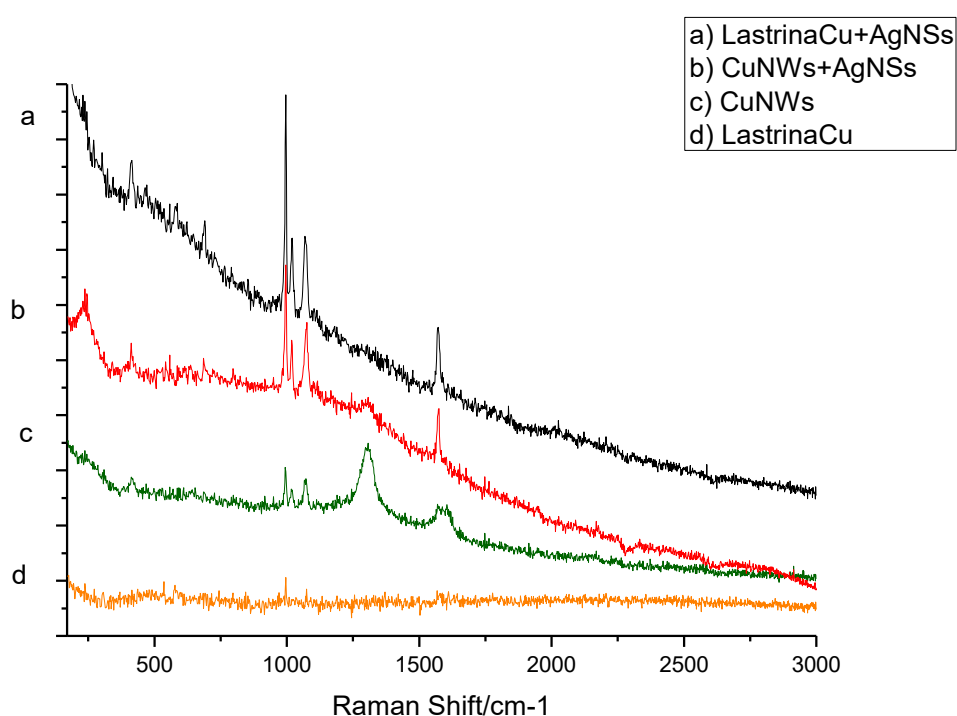


Figura 3.29: Confronto fra gli spettri del benzentiolo  $10^{-3}$  M acquisiti sui quattro substrati a base di rame.

Una volta stabilito che sia per l'oro che per il rame il substrato migliore è il sistema gerarchico NWs+NSs, si è indagato quale dei due metalli favorisse maggiormente l'amplificazione dell'effetto Raman del benzentiolo ad essi adsorbito. Sono stati dunque confrontati gli spettri acquisiti impiegando come substrato rispettivamente AuNWs+AgNSs e CuNWs+AgNSs. La figura 3.30 evidenzia con chiarezza come l'*enhancement* indotto dai nanofili d'oro sia nettamente superiore rispetto a quello dei nanofili di rame: i picchi risultano infatti molto più intensi, definiti e numerosi ed il back-ground dovuto alla fluorescenza più basso. Si può pertanto concludere che l'oro rappresenta il metallo più indicato per ottenere l'effetto SERS ed il sistema gerarchico migliore è quello

costituito da AuNWs+AgNSs. I risultati ottenuti concordano con quanto osservato da Kwan (Kwan et al., 2013; Kwan et Yoon, 2005; Kim et Lee, 2005) su strutture metalliche di morfologia molto diversa.

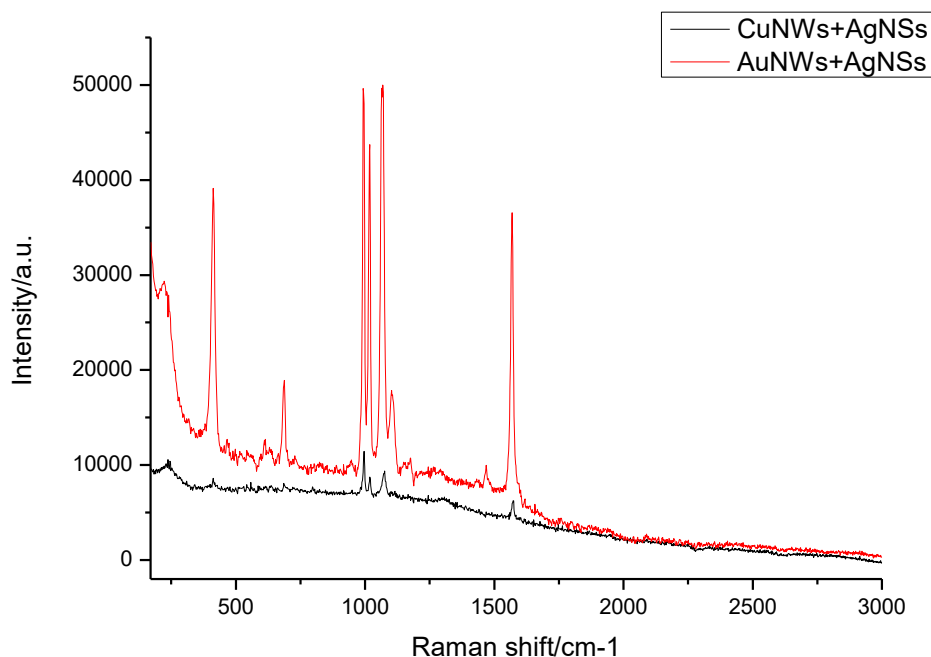


Figura 3.30: Confronto fra gli spettri del benzotriolo  $10^{-3}$  M acquisiti su AuNWs+AgNSs e CuNWs+AgNSs.

Le analisi effettuate hanno messo in luce la possibilità di rivelare il benzotriolo adsorbito da soluzioni più diluite ( $10^{-5}$  M) su substrati nanostrutturati a base di oro, mentre maggiori difficoltà si riscontrano col rame. Nel caso dell'oro, eccetto che in assenza di nanomateriali è sempre possibile riconoscere i principali segnali del benzotriolo, sebbene estremamente deboli ed associati ai picchi della cisteammina e di altri interferenti, probabilmente impurezze, che il segnale poco intenso dell'analita non riesce ad oscurare a causa della bassa concentrazione in cui è presente. Anche in questo caso lo spettro migliore si ottiene col sistema gerarchico AuNWs+AgNSs (Figura 3.31)

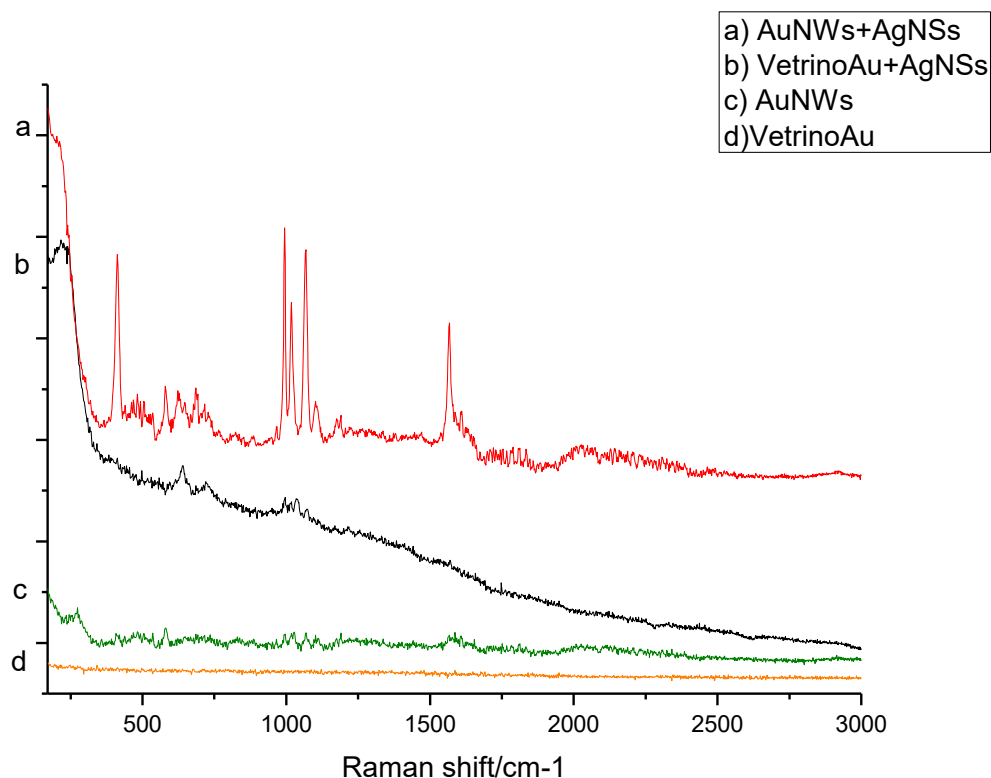


Figura 3.31: Confronto fra gli spettri del benzoinolo  $10^{-5}$  M acquisiti sui quattro substrati a base di oro.

Per quanto riguarda invece il rame, analizzando il benzoinolo a concentrazione  $10^{-5}$  M si ha la conferma della minor efficacia come substrato SERS di questo metallo rispetto all'oro: soltanto nel caso dei nanofili è stato possibile riconoscere i segnali del benzoinolo, appena distinguibili dal back-ground di fluorescenza a causa della bassissima intensità ed associati a picchi più intensi attribuibili alla cisteammina e ad altri interferenti. Si sottolinea inoltre che questo risultato è stato conseguito impiegando i CuNWs elettrodepositati su elettrodo di lavoro in glassy carbon, il cui contributo è stato nettamente migliore rispetto a quelli ottenuti su rame. Questi ultimi infatti non hanno permesso l'individuazione del benzoinolo (Figura 3.32).

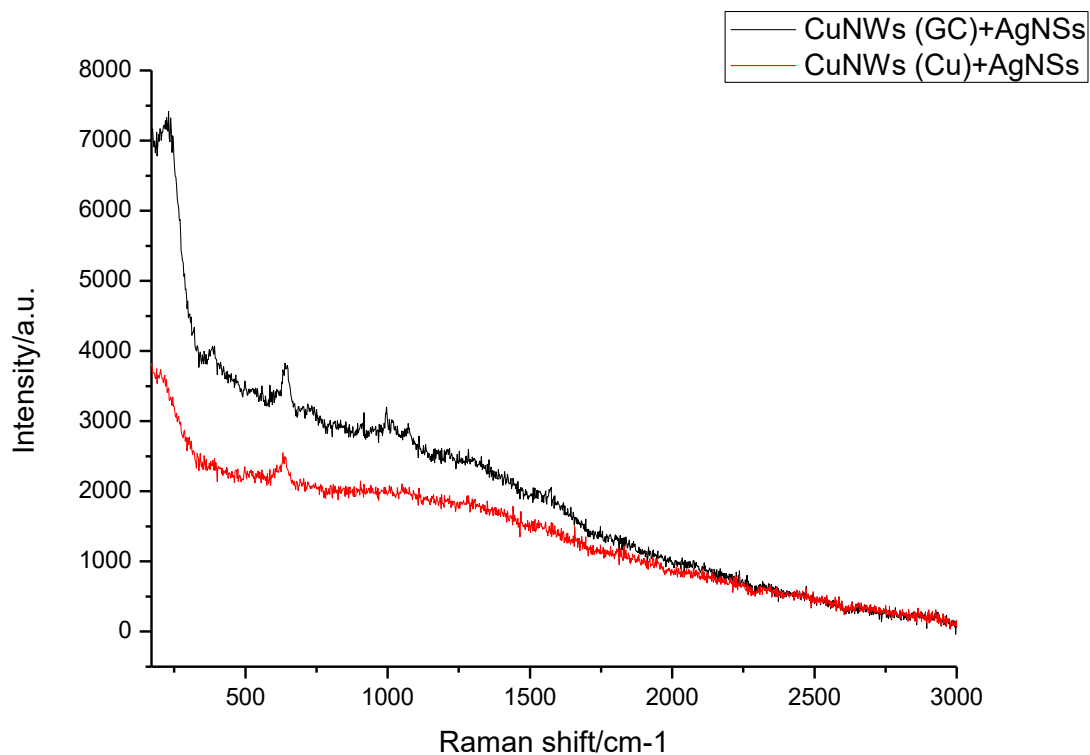


Figura 3.32: Confronto fra gli spettri del benzentiolo  $10^{-5}$  M acquisiti su AgNSs legate a CuNWs elettrodepositati su rame e glassy carbon.

Questa concentrazione sembra corrispondere al limite di rivelabilità sperimentale dato che le analisi effettuate mediante substrati equilibrati con BT a concentrazione  $10^{-6}$  M non rivelano alcun segnale utile. Sebbene negli spettri misurati su AuNWs con o senza nanostelle si possano osservare alcuni deboli segnali, questi sono dovuti alla cisteammmina e ad eventuali interferenti e non all'analita.

### **3.3 Studi SERS su coloranti d'interesse artistico**

Le analisi SERS effettuate sul benzenotiole hanno messo in luce come l'oro rispetto al rame permetta di ottenere un *enhancement* Raman più significativo e, di conseguenza, spettri meglio risolti e definiti, specialmente se in associazione con le nanostelle d'argento. Pertanto, per l'analisi dei coloranti d'interesse artistico, i cui segnali Raman sono molto più deboli rispetto a quelli del benzenotiole, si è deciso di utilizzare i substrati basati su questo metallo nobile. Nell'analizzare il rosso carminio e la lacca di garanza bisogna inoltre tenere in considerazione il fatto che non si tratta di coloranti puri, bensì di lacche: le molecole organiche d'interesse si trovano pertanto inserite in una matrice complessa con cui interagiscono e ciò influisce sul loro legame col substrato SERS.

#### **3.3.1 Rosso Carminio**

##### **3.3.1.1 Interazione fra rosso carminio e substrati SERS**

L'acido carminico, principale cromoforo della cocciniglia, può interagire col substrato metallico a seguito di tre processi di deprotonazione, che interessano rispettivamente i gruppi idrossilici delle funzioni carbossiliche in posizione 2, 6 e 5. Un'analoga interazione si verifica anche durante il processo di mordenzatura in cui il colorante carminio viene trasformato in lacca: i cationi  $Al^{3+}$  si legano infatti all'acido carminico formando un complesso. Il carminio analizzato nel presente lavoro di tesi non contiene acido carminico come molecola pura, bensì in forma di lacca. Ciò implica che si trovi già complessato con un altro metallo, l'alluminio; pertanto l'interazione con le nanoparticelle e conseguentemente l'identificazione mediante SERS di questo colorante risultano di maggiore complessità. Tutto ciò rende i campioni preparati più difficili da analizzare, ma d'altro canto meglio approssimabili ad una situazione reale.

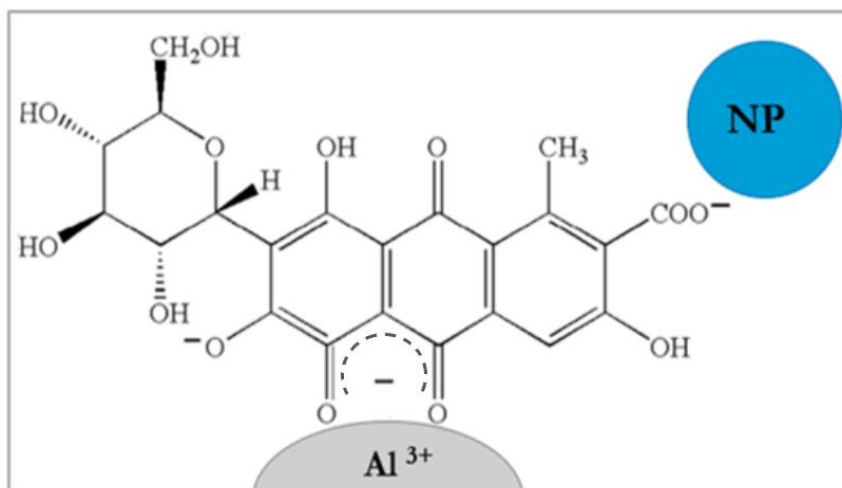


Figura 3.33: l'acido carminico deprotonato in posizione 2, 6 e 5 interagisce con atomi metallici, rendendo così possibili la formazione di una lacca e l'interazione col substrato SERS.

### 3.3.1.2 Spettri SERS del rosso carminio

Di seguito si riportano gli spettri SERS ottenuti facendo adsorbire la lacca rosso carminio (soluzione metanolica  $10^{-3}$  M) sui quattro diversi substrati SERS.

La figura 3.34 mostra gli spettri acquisiti sul vetrino da microscopio dorato con o senza nanostelle precedentemente concentrate depositate su di esso. Il solo substrato metallico macrostrutturato, come nel caso del benzentiolo, non porta ad ottenere alcun segnale, mentre la presenza delle nanostelle d'argento porta a risultati nettamente migliori: oltre al picco del colloide a  $202\text{ cm}^{-1}$ , si riconoscono infatti alcuni picchi associabili al carminio, di cui fondamentale quello a  $1297\text{ cm}^{-1}$ . Il segnale a  $1024\text{ cm}^{-1}$ , non rientrante tra quelli attribuibili al colorante, potrebbe essere legato alla presenza di ioni citrato residui sulla superficie delle nanostelle d'argento (Sanchèz-Cortèz et Garcia-Ramos, 1998). Per l'assegnazione delle bande negli spettri si rimanda allo spettro Raman di letteratura in appendice C (spettro D).



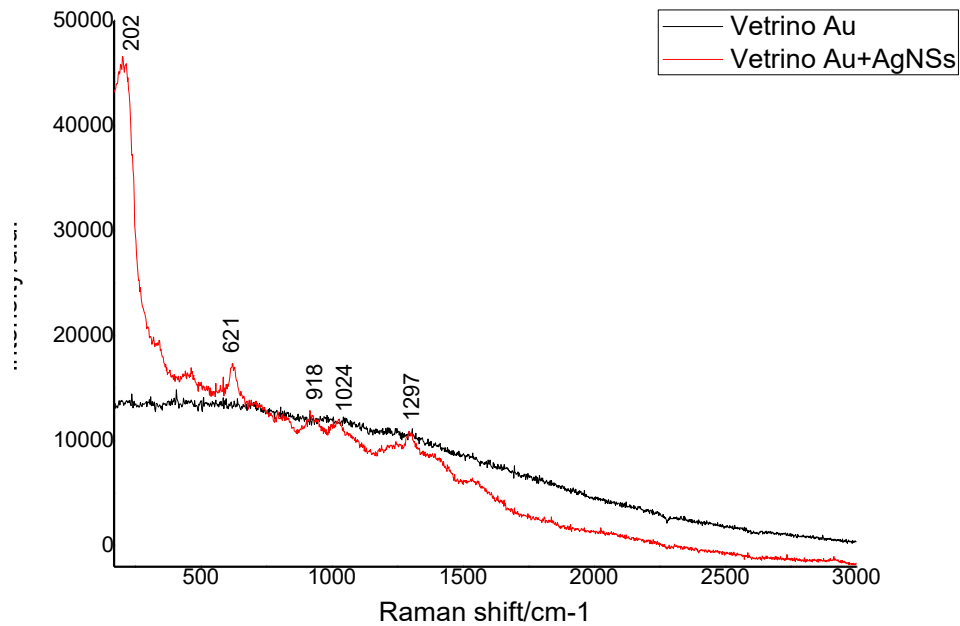


Figura 3.34: Spettri SERS del carminio su vetrino dorato con e senza nanostelle.

Uno spettro ancora migliore si ottiene invece utilizzando come substrato i nanofili d'oro: nonostante da soli non risultino sufficienti ad ottenere un'amplificazione Raman che renda distinguibili i segnali del carminio, in associazione con le nanostelle d'argento portano ad un ottimo risultato. Oltre al picco del colloide si riconoscono infatti tutti quelli principali del colorante, di cui molti non erano distinguibili impiegando le sole nanostelle. Anche in questo caso il sistema gerarchico AuNWs+AgNSs si conferma il substrato più efficace per indurre un'amplificazione del segnale Raman delle molecole ad esso adsorbite.

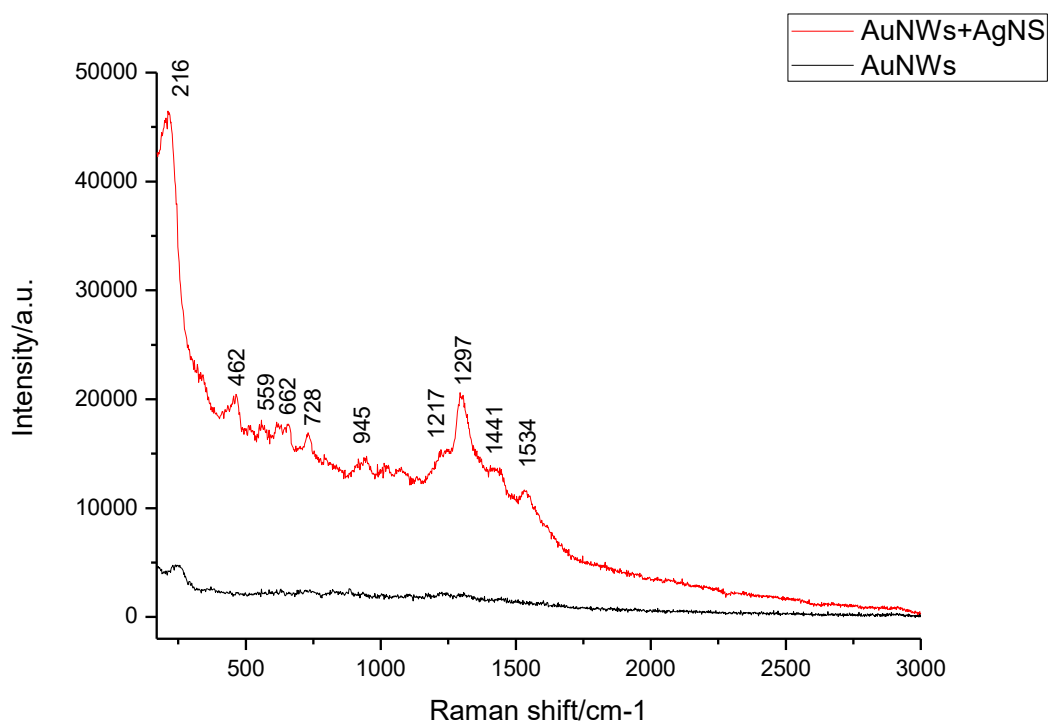


Figura 3.35: Spettri SERS del carminio su AuNWs con e senza nanostelle.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei segnali Raman registrati effettuando la misura sui diversi substrati, confrontati con quelli riportati in letteratura ed associati alla vibrazione del gruppo funzionale corrispondente (Canamares M.V., 2008).

Riferimen- -to	Vetrin o Au	VetrinoA u+ NSs	AuN Ws	AuNWs+N Ss	Assegnazione
465	-	-	-	462 m	Vibrazioni dello scheletro
565	-	-	-	559 w	
680	-	621 m	-	662 w	$\gamma(\text{CCC})/\gamma_{\text{Glu}}(\text{CH})/\gamma_{\text{Glu}}(\text{COH})$
733	-	-	-	728 m	$\rho(\text{CH}_3)/\gamma(\text{CH})/\gamma(\text{COH})/\tau(\text{CCCC})$
967	-	918 w	-	945 w	$\delta_{\text{Glu}}(\text{COH})/\rho(\text{CH}_3)/\delta(\text{CCC})$
1222	-	-	-	1217 sh	$\delta(\text{C}_5\text{OH})/\delta(\text{C}_4\text{H})/\nu(\text{CC})/\delta_{\text{Glu}}(\text{CH})$
1297	-	1297 m	-	1297 s	$\delta(\text{C}_5\text{OH})/\delta(\text{C}_8\text{OH})/\delta(\text{C}_3\text{OH})/\nu(\text{CC})$

1447	-	-	-	1441 sh	$\delta(\text{CH}_3)$
1564	-	-	-	1534 m	$\nu_{\text{III}}(\text{CC})/\delta(\text{C}_8\text{OH})/\delta(\text{CH})$
	-	-	225 s	216 s	NPs

Tabella 3.6: Confronto fra la posizione delle bande (in  $\text{cm}^{-1}$ ) del rosso carminio riportate in letteratura con la loro assegnazione e quelle ottenute sperimentalmente sui vari substrati. Nella descrizione relativa dell'intensità delle bande: sh= shoulder, w= weak, m= medium e s= strong.

### 3.3.2 Lacca di Garanza

A seguito dei risultati positivi ottenuti dall'analisi del carminio, si è deciso di studiare la rivelazione di spettri SERS relativi alla lacca di garanza.

#### 3.2.2.1 Interazione fra lacca di garanza e substrati SERS

L'alizarina costituisce l'antrachinone presente in maggiore abbondanza nella lacca di garanza. La sua interazione con atomi metallici avviene ad opera del doppietto elettronico dell'ossigeno appartenente al carbonile e all'idrossile deprotonato. Questo processo di deprotonazione ha inizio dal gruppo -OH in posizione 1 e il doppietto elettronico che ne deriva origina una struttura di risonanza col carbonile adiacente; la seconda deprotonazione avviene invece in posizione 2 ed è probabilmente legata all'aumento del pH. Questa nuova conformazione della molecola permette una buona interazione con gli atomi metallici, in grado di accettare doppietti elettronici nei loro orbitali liberi.

Come nel caso del carminio, tuttavia, la garanza impiegata è già di per sé in forma di lacca e pertanto l'alizarina vi si trova già legata con l'alluminio a seguito di un processo di complessazione che ha probabilmente luogo per mezzo della struttura di risonanza tra il carbonile e l'idrossile deprotonato, rispettivamente in posizione in posizione 9 ed 1. Ciò ostacola in parte l'interazione col substrato SERS che si realizza pertanto attraverso il gruppo -OH deprotonato in posizione 2 o il gruppo -C=O in posizione 10. Come conseguenza, questa mancanza di siti con cui le nanoparticelle possono interagire rende la lacca di garanza uno dei coloranti più difficili da analizzare mediante SERS.

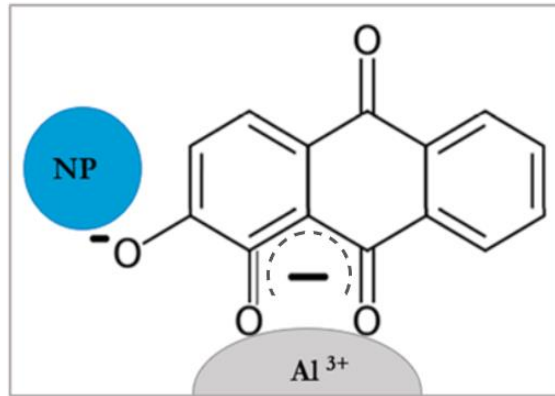


Figura 3.36: l'alizarina deprotonata in posizione 1 e 2 interagisce con atomi metallici, rendendo così possibili la formazione di una lacca e l'interazione col substrato SERS.

### 3.3.2.2 Spettri SERS della lacca di garanza

Data la difficoltà prospettata nel riconoscere la lacca di garanza, si è deciso di utilizzare come substrato quello che le precedenti misure sul benzentiolo e sul carminio hanno confermato essere il migliore: le nanostelle d'argento associate ai nanofili d'oro.

Lo spettro acquisito rivela la presenza di alcuni segnali, seppur parzialmente coperti da un back-ground di fluorescenza ed un rumore di fondo consistenti

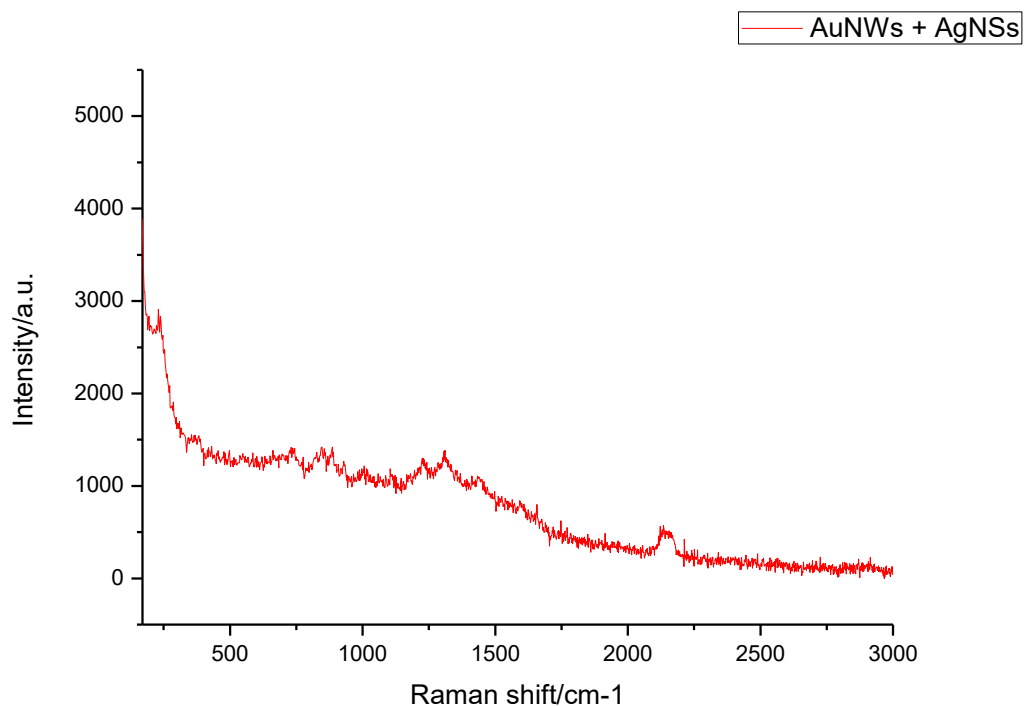


Figura 3.37: Spettro SERS della lacca di garanza su AuNWs+AgNSs.

Essendo la zona dello spettro compresa fra 500 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  di particolare interesse per l'identificazione della lacca di garanza, si è proceduto con lo studio e l'assegnazione dei picchi concentrandosi su di essa, di cui si riporta a seguire un ingrandimento (Figura 3.38).

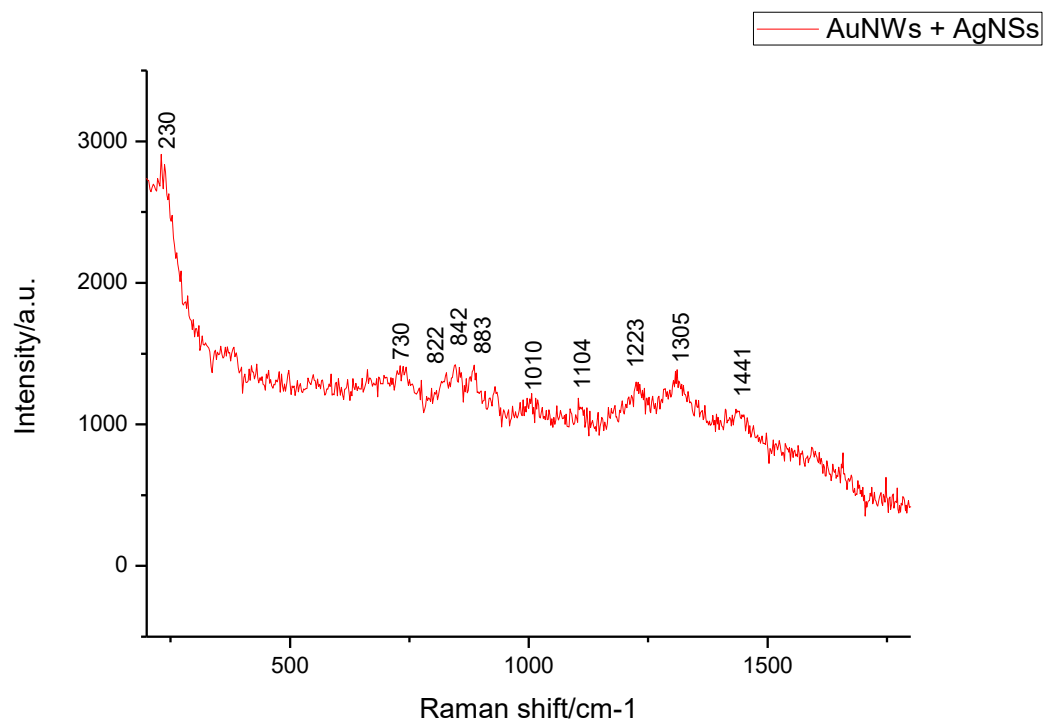


Figura 3.38: Spettro SERS della lacca di garanza su AuNWs+AgNSs, particolare della zona compresa fra 200 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

Sulla base del confronto fra lo spettro acquisito e le informazioni riportate in letteratura (spettro E in appendice C; Sánchez-Cortes et al., 1998), i picchi registrati sono stati associati a quelli della lacca di garanza come riportato in tabella 3.7.

Riferimento	AuNWs+NSs	Attribuzione
738	730 br	$\delta(\text{CCC})$
818	822 vw	$\nu(\text{CC})/\delta(\text{CH})$
832	842 w	$\gamma(\text{CH})$
887	883 w	$\gamma(\text{CH})$
1015	1010 vw	$\nu(\text{CC})/\delta(\text{CCC})$

1216	1223 m	$\delta(\text{CH})/\delta(\text{COH})$
1325	1305 m	$\nu(\text{CC})/\delta(\text{CCC})$
1441	1441 w	$\nu(\text{CC})/\delta(\text{CH})$
	230 s	NPs

Tabella 3.7: Confronto fra la posizione delle bande (in  $\text{cm}^{-1}$ ) della lacca di garanza riportate in letteratura con la loro assegnazione e quelle ottenute sperimentalmente. Nella descrizione relativa dell'intensità delle bande: sh= shoulder, w= weak, m= medium e s= strong.

### 3.3.3 Discussione dei risultati

Il confronto e lo studio dei risultati ottenuti dalle analisi SERS dei coloranti di interesse artistico hanno permesso di giungere alle conclusioni di seguito presentate.

Per quanto riguarda il rosso carminio, il confronto fra gli spettri ottenuti sui quattro diversi substrati (figura 3.39) dimostra come l'identificazione del colorante sia avvenuta con successo effettuando la misura sia sul vetrino che sui nanofili d'oro su cui era stato depositato il colloide di nanostelle concentrato. Lo spettro acquisito dal solo vetrino dorato non presenta invece alcun segnale, mentre nel caso dei nanofili da soli si distingue chiaramente soltanto il picco attribuibile al nanomateriale stesso. Quanto osservato risulta in parte in accordo coi risultati ottenuti per il benzentiolo: il substrato metallico macrostrutturato non induce di per sé alcun effetto SERS, mentre gli altri tre, caratterizzati dalla presenza di almeno un nanomateriale, permettono di abbassare la fluorescenza e di rendere distinguibili alcuni segnali. Tuttavia, mentre il BT è in grado di legarsi anche all'oro, la lacca si lega soltanto all'argento e pertanto risulta identificabile unicamente in presenza di AgNSs e non con i soli AuNWs.

Paragonando dunque i due spettri ottenuti in presenza di nanostelle d'argento, si ha la conferma di quanto già osservato per il benzentiolo: l'associazione di due nanostrutture porta ad ottenere un'amplificazione del segnale Raman dell'analita maggiore rispetto al caso in cui un solo materiale sia presente. Lo spettro è infatti caratterizzato non solo da picchi del carminio più intensi e definiti, ma anche più numerosi. L'argento rappresenta dunque il

materiale chiave dell'adsorbimento, mentre l'oro intensifica il segnale Raman in quanto facilita la creazione di *hot spot* di NSs rispetto al colloide applicato da solo o sulla lastrina metallica.

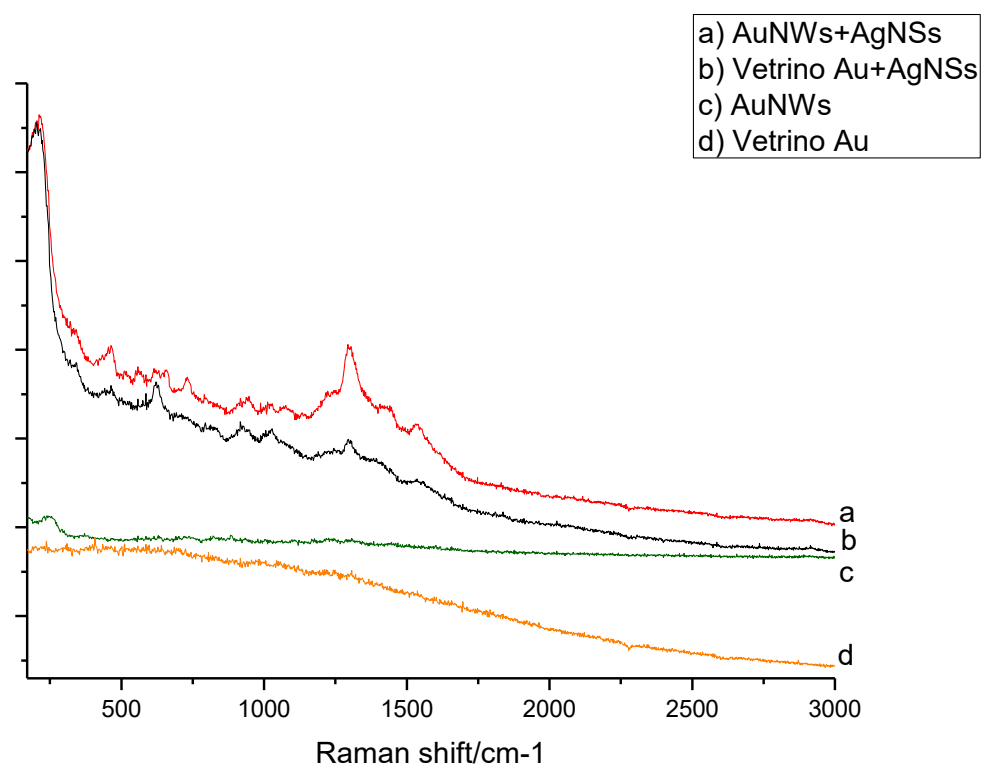


Figura 3.39: Confronto fra gli spettri SERS del rosso carminio acquisiti sui quattro diversi substrati.

Per quanto riguarda invece la lacca di garanza, lo spettro SERS si è rivelato più difficile da acquisire rispetto a quello del rosso carminio. Infatti l'alizarina, principale molecola colorante della lacca di garanza, una volta complessata con l' $\text{Al}^{3+}$ , si ritrova con una disponibilità di siti reattivi per legarsi alle nanoparticelle inferiore rispetto all'acido carminico. Impiegando il sistema gerarchico AuNWs+AgNSs è stato comunque possibile ottenere uno spettro in cui si distinguono alcuni dei picchi ad essa associabili, nonostante la debole intensità e l'elevato back-ground di fluorescenza. Anche in questo caso in assenza di nanostrutture non si riconosce invece alcun segnale, se non un'intensa fluorescenza (Figura 3.40). In ogni caso ci si ripropone per il futuro di eseguire ulteriori studi per comprendere se la debole intensità dei segnali nello spettro dipenda solo dalla natura chimica di questa lacca o possano esserci miglioramenti andando ad agire sui parametri sperimentali.

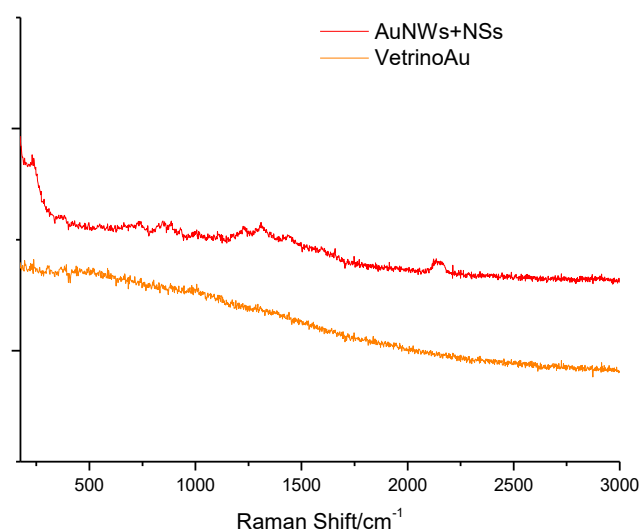


Figura 3.40: Spettro SERS della lacca di garanza con e senza sistema gerarchico di nanostrutture.

In conclusione, considerando i risultati SERS ottenuti sul rosso carminio e sulla lacca di garanza e la struttura chimica delle molecole coloranti che li contraddistinguono, risulta che quest'ultima riveste un ruolo importante nell'amplificazione dell'effetto Raman. Il gruppo carbossilico e la molecola di zucchero presenti nell'acido carminico gli conferiscono infatti una maggiore affinità col substrato metallico, favorendo il legame con le nanoparticelle. La garanza invece, in mancanza di tali gruppi, si adsorbe con maggiori difficoltà e di conseguenza lo spettro SERS risulta meno intenso e definito.



### 3.4 Analisi di mock-up: uno sviluppo futuro

In vista dei risultati positivi ottenuti dall'analisi SERS dei coloranti commerciali in forma di lacca, sono state realizzate alcune prove preliminari per verificare la possibilità di estendere l'applicazione dei substrati SERS gerarchici sviluppati all'analisi di campioni reali d'interesse artistico.

Le prove effettuate hanno messo in luce che il protocollo seguito per estrarre il colorante dai campioni è potenzialmente efficace, permettendo di impiegare il nuovo substrato SERS composto da AuNWs+AgNSs anche per l'analisi di campioni complessi. Tuttavia, in nessun caso è stato possibile riconoscere gli spettri dei coloranti corrispondenti: i picchi dei solventi scelti per l'estrazione, il cui segnale Raman è molto più intenso, vanno infatti a coprire quelli dell'analita, la cui intensità già di per sé inferiore è ulteriormente smorzata dalla matrice complessa di legante in cui è inserito.

Ci si ripropone dunque di perfezionare il sistema, andando ad individuare un solvente più adatto allo scopo, così da poterlo testare per l'analisi di cross section e altri campioni d'interesse artistico, se non addirittura eseguendo la micro estrazione dall'opera stessa.

# CONCLUSIONI

Il lavoro sperimentale svolto ha permesso di raggiungere le seguenti conclusioni:

- Combinando soft template (per AgNSs) ed hard template (per NWs) è possibile creare strutture gerarchiche che comprendono entrambi.
- Il sistema AuNWs+AgNSs si è rivelato il più efficace nell'amplificare il segnale Raman di molecole ad esso adsorbite, sia nel caso di una sonda (BT) che di coloranti reali.
- La struttura chimica del colorante ha un ruolo importante nell'effetto SERS e nella conseguente amplificazione del segnale Raman: la presenza di un gruppo carbossilico -COOH e di una molecola di zucchero nella struttura del rosso carminio gli conferiscono infatti proprietà di adsorbimento che la lacca di garanza non ha. Questa peculiarità può essere vantaggiosamente sfruttata sui dipinti per riconoscere una velatura in rosso carminio da una in lacca di garanza: il primo dà uno spettro SERS ben definito che manca nel caso della seconda.
- La metodologia analitica messa a punto ha rivelato di poter essere estesa al riconoscimento di un maggior numero di coloranti organici - naturali e sintetici-, nonché di essere applicata in futuro all'analisi di campioni reali.

## APPENDICE A: Tecniche analitiche impiegate

### Microscopia a scansione elettronica (SEM)

La microscopia a scansione elettronica (SEM) sfrutta un fascio di elettroni focalizzato sulla superficie del campione per ottenere informazioni dettagliate sulla morfologia e sulla microstruttura di esso. A differenza che la tradizionale microscopia ottica, la cui risoluzione è limitata per effetto della diffrazione alla lunghezza d'onda della luce, impiegando il fascio di elettroni, caratterizzati da  $\lambda$  dell'ordine dell'angström, è possibile ottenere un'informazione molto più dettagliata ed un potere risolutivo assai elevato (5-10 nm).

Per registrare un'immagine SEM, un fascio di elettroni prodotti da un cannone elettronico ed accelerati ad un'energia compresa fra 1 e 30 keV è finemente focalizzato sulla superficie del campione attraverso un sistema di lenti elettromagnetiche e deflesso progressivamente da una coppia di bobine in modo da eseguire una scansione del substrato. L'intero processo di emissione, focalizzazione ed interazione fascio-campione avviene in condizioni di vuoto ultraspinato assicurato da un sistema di pompe.

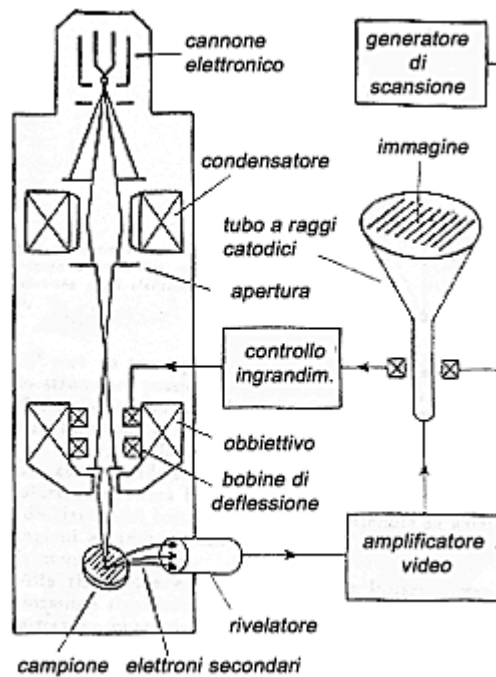


Figura 1A: Schema a blocchi di un tipico microscopio elettronico a scansione.

Quando la superficie del campione è investita da elettroni ad elevata energia emessi dalla sorgente (elettroni primari), sono prodotti in ogni direzione particelle e quanti di radiazione elettromagnetica, il cui numero e la cui energia dipendono dalla composizione e dalla topografia superficiale del campione stesso. Fra i numerosi segnali prodotti dall'interazione fascio-campione, tre sono di particolare importanza nella microscopia elettronica a scansione: gli elettroni secondari, gli elettroni retrodiffusi e i raggi X di fluorescenza.

Gli elettroni secondari, convenzionalmente definiti come elettroni uscenti dalla superficie del campione con energia minore o uguale a 50 eV, si generano ad una profondità superficiale di pochi nanometri e scaturiscono dall'interazione del fascio primario con gli elettroni delle orbitali più esterni degli atomi del campione. Questi elettroni forniscono informazioni sulla topografia del campione e sull'eventuale presenza e distribuzione di campi magnetici o elettrici.

Gli elettroni retrodiffusi hanno invece un'energia maggiore di 50 eV e derivano principalmente dalle interazioni multiple o singole del fascio primario con i nuclei degli atomi del campione e permettono di risalire al numero atomico medio della zona di provenienza (circa qualche micron sotto la superficie del campione) e di studiare la topografia e la struttura cristallina del campione.

I prodotti del fascio primario con la superficie del campione vengono raccolti dal rivelatore, trasformati in segnali elettrici e trasformati in un'immagine in scala di grigio la cui luminosità dipende dall'intensità del segnale raccolto. L'interazione con gli elettroni esige che i campioni analizzati al SEM siano conduttori in modo da evitare l'accumulo di cariche sulla superficie e di calore; i campioni non conduttori devono pertanto essere rivestiti da un sottile film metallico.

Sempre sfruttando l'interazione elettrone-materia ma andando a raccogliere i segnali forniti dall'emissione di raggi X, è possibile associare all'osservazione microscopica la microanalisi EDX che permette di riconoscere la composizione chimica elementare del campione stesso.

## **Spettrofotometria UV-Visibile**

La spettrofotometria UV-Vis si basa sull'assorbimento di fotoni la cui lunghezza d'onda varia dal vicino infrarosso (1300-800 nm), al visibile (800-400 nm), al vicino ultravioletto

(400-300 nm). Nell'interazione col campione, l'energia associata a queste lunghezze d'onda viene assorbita da particolari elettroni presenti nelle molecole, suscitandone così la transizione dallo stato fondamentale ad uno stato elettronico eccitato. Dal momento che per ciascuna molecola l'energia dei fotoni assorbiti dipende dalla sua struttura energetica quantizzata, è possibile stabilire una relazione univoca fra lo spettro di assorbimento e la specie chimica in questione.

Questo tipo di spettroscopia, oltre a permettere l'identificazione dei composti, può essere utilizzata anche per scopi quantitativi grazie alla legge di Lambert-Beer, che mette in relazione l'assorbanza di una soluzione con la sua concentrazione:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

dove:

$$A = \text{assorbanza} = \log \frac{I}{I_0}$$

$\varepsilon$  = coefficiente di estinzione molare in L/(cm · mol)

$l$  = cammino ottico

$c$  = concentrazione della soluzione in g/L

Nel presente lavoro di tesi la spettrofotometria UV-Vis è stata impiegata per misurare il plasmone di risonanza superficiale dei colloidi: quando la frequenza dei fotoni incidenti corrisponde a quella di oscillazione degli elettroni delle nanoparticelle metalliche, l'assorbimento raggiunge il suo massimo. Quest'ultimo parametro risulta pertanto di fondamentale importanza nella caratterizzazione dei substrati SERS.

## **Tecniche voltammetriche**

Le tecniche voltammetriche impiegate nel presente lavoro di tesi sono la voltammetria ciclica per la caratterizzazione dei NEEs e delle soluzioni di deposizione del rame e la cronoamperometria per la sintesi elettrochimica dei CuNWs. Entrambe appartengono alla categoria dei metodi dinamici potenziostatici (a potenziale controllato) e operano in condizioni di corrente non nulla. Il potenziale elettrodico viene infatti sfruttato per far avvenire una reazione di trasferimento elettronico ed il parametro studiato è la corrente

risultante, che riflette la velocità con cui gli elettroni vengono trasferiti attraverso l'interfaccia elettrodo-soluzione. Il potenziale svolge dunque un ruolo fondamentale, in quanto costituisce la forza motrice che determina la tendenza delle diverse specie chimiche a perdere (ossidazione) o ad acquistare (riduzione) elettroni.

Le misure elettrochimiche vengono effettuate utilizzando una cella chimica a tre elettrodi, costituita da un recipiente contenente la soluzione con l'analita ed un eccesso di elettrolita di supporto e tre elettrodi. L'elettrolita di supporto svolge l'importante funzione di diminuire la resistenza della soluzione, di eliminare l'effetto della migrazione e di mantenere costante la forza ionica ed è in genere costituito da una soluzione salina o da un tampone. I tre elettrodi sono invece l'elettrodo di lavoro, l'elettrodo di riferimento e il contro elettrodo. Il primo è l'elettrodo al quale avviene il processo elettrochimico d'interesse; il secondo, il cui potenziale è noto e costante, serve per misurare la differenza di potenziale con l'elettrodo di lavoro per risalire al potenziale di cella; il terzo, in genere una spirulina in platino, è invece l'elettrodo a cui avviene il processo opposto rispetto all'elettrodo di lavoro.

### Voltammetria ciclica

La voltammetria ciclica (CV) è la tecnica più ampiamente utilizzata nello studio dei meccanismi delle reazioni elettrochimiche grazie al gran numero di informazioni che è in grado di fornire su un sistema redox. In particolare essa consente una rapida individuazione dei potenziali redox delle specie elettroattive, oltre ad una rapida valutazione degli effetti del mezzo e delle condizioni sperimentali sullo svolgimento del processo.

La voltammetria ciclica consiste di una scansione lineare del potenziale di forma triangolare imposta ad un elettrodo di lavoro stazionario (in assenza di moti all'interno della soluzione). Durante la misura, che può prevedere uno o più cicli, un potenziostato misura la corrente che passa nella cella in funzione del potenziale applicato e il prodotto finale è un voltammogramma ciclico, grafico che riporta la corrente in funzione del potenziale. Il voltammogramma ciclico permette di caratterizzare il sistema indicando: il potenziale standard  $E^\circ$  della coppia redox a seconda della posizione dei picchi anodico e catodico ( $E^\circ \cong E^{1/2}$ ), se la reazione è reversibile o meno in base al rapporto fra l'intensità di corrente del picco anodico e catodico e il numero di elettroni scambiati  $n$  in base alla separazione dei picchi ( $\Delta E = 0.059/n$ ). Nel presente lavoro di tesi la voltammetria ciclica è stata sfruttata per caratterizzare le soluzioni di deposizione dei CuNWS così da poter scegliere quella più

adatta e per decidere i parametri da impostare durante la deposizione, oltre che per la caratterizzazione dei NEEs fabbricati.

### Cronoamperometria i-t

La cronoamperometria misura in funzione del tempo la corrente che attraversa un elettrodo di lavoro a cui viene applicato un potenziale costante e maggiore di quello ossido-riduttivo della coppia redox in esame. Risultato dell'analisi è un cronoamperogramma, tracciato che mostra l'evoluzione della corrente in funzione del tempo. Nel presente lavoro di tesi la cronoamperometria è stata utilizzata per effettuare la deposizione elettrochimica dei CuNWs, imponendo la riduzione degli ioni  $\text{Cu}^{2+}$  in soluzione a rame metallico  $\text{Cu}^0$  e studiando l'andamento della curva i-t per decidere quando arrestare il processo.

## **APPENDICE B: Voltammetria ciclica per la scelta della soluzione di deposizione di CuNWs**

Di seguito si riportano i voltammogrammi ciclici registrati su tre diversi elettrodi di lavoro (rame, glassy carbon e oro) alle diverse velocità di scansione per le cinque soluzioni di solfato di rame studiate per ottimizzare la deposizione elettrochimica di CuNWs (cfr. Cap. 2, par. 2.2.4). La prima serie di tabelle si riferisce alle misure in cui è stato impiegato come contro elettrodo una lastrina di rame, la seconda a quelle in cui è stato impiegato l'Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>. A seguire vengono invece presentate le tabelle riassuntive relative alle informazioni fornite da ciascun voltammogramma ( $E_p$  e  $I_p$ ) per ciascun elettrodo di lavoro.

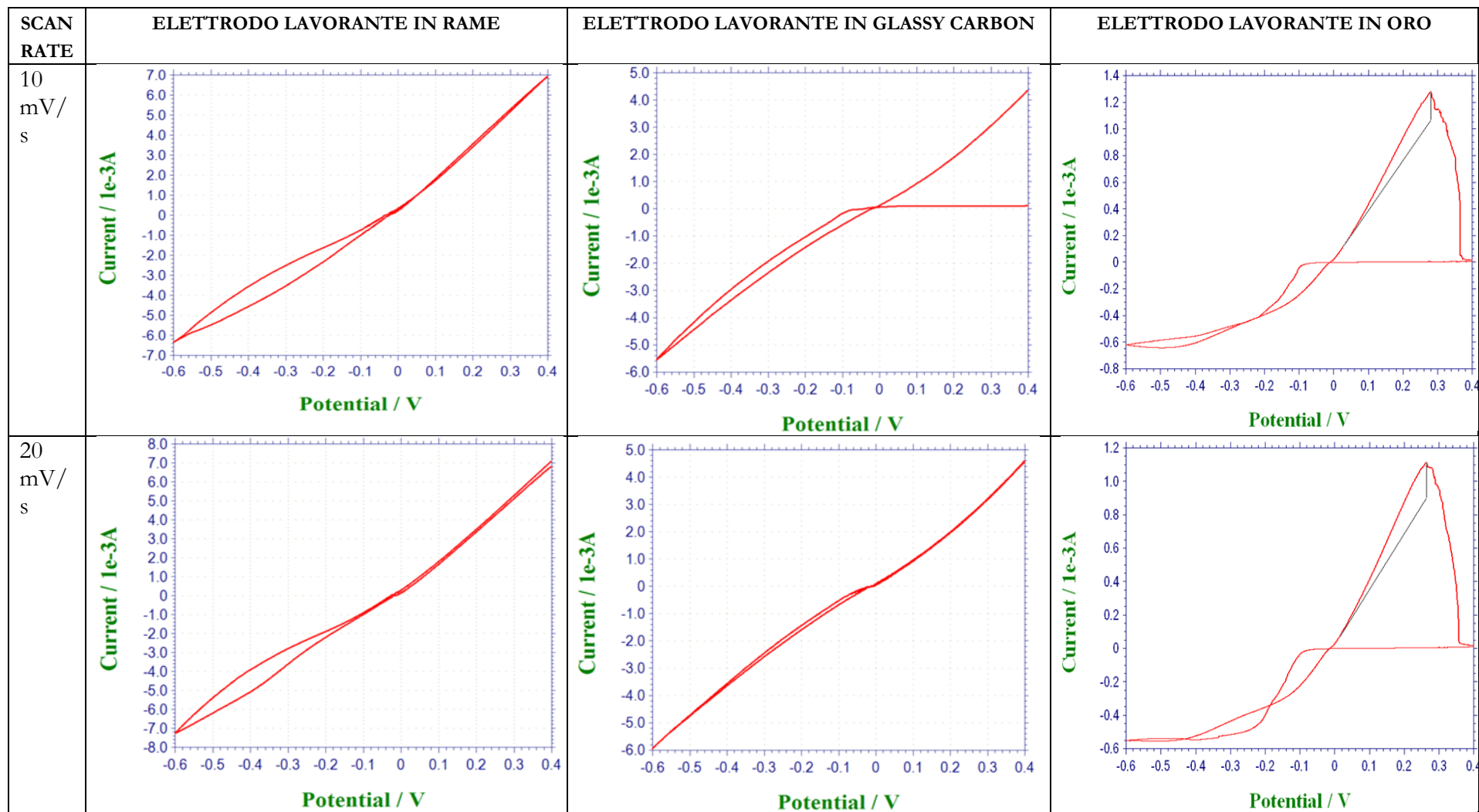
I voltammogrammi ciclici sono stati registrati impostando i seguenti parametri:

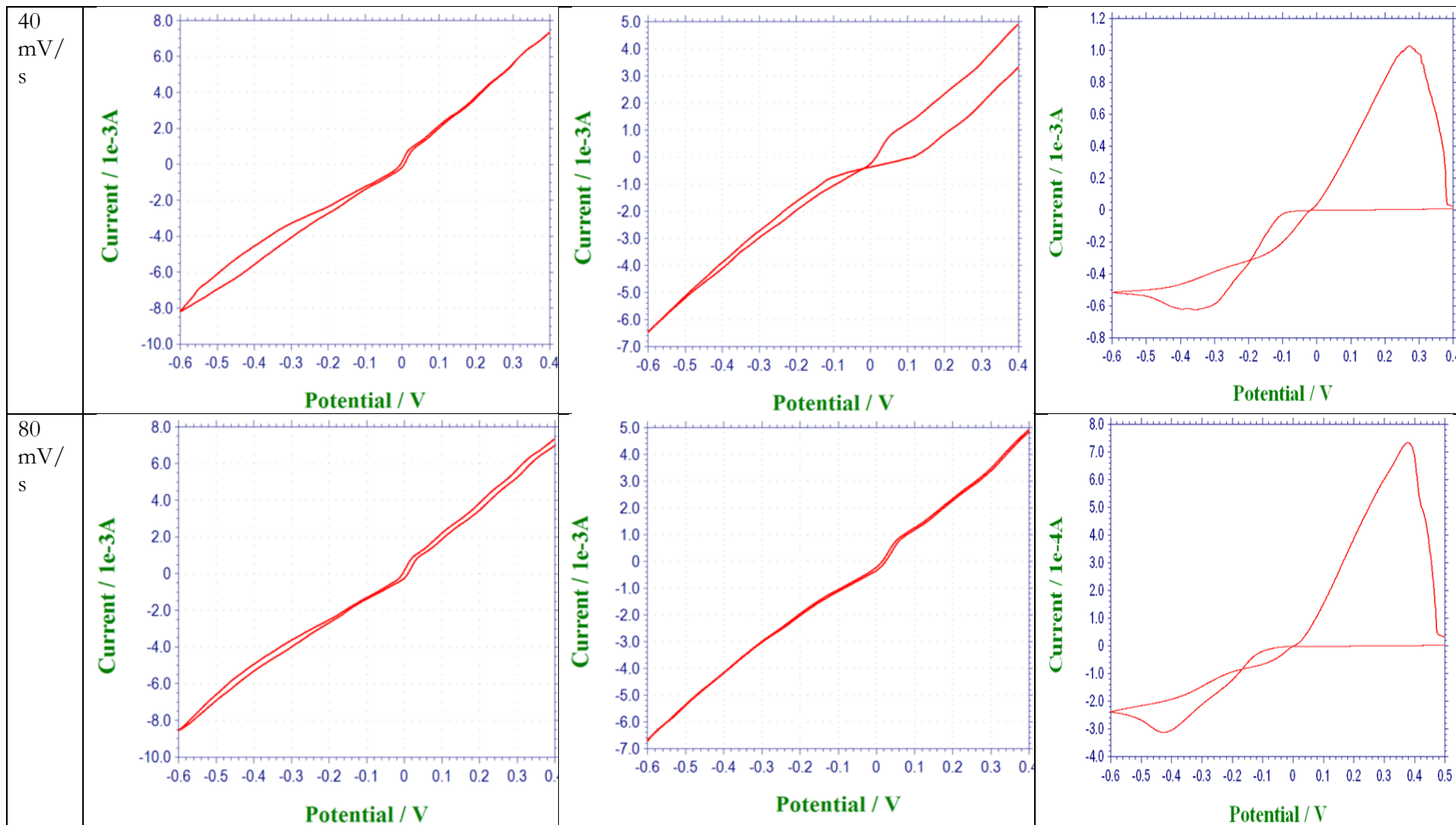
- Potenziali: da +0,4 V a -0,6 V (in alcuni casi la finestra è stata ampliata fino a +0.6 V per non tagliare il picco)
- Velocità di scansione: la misura è stata eseguita a 10, 20, 40, 80 mV/s



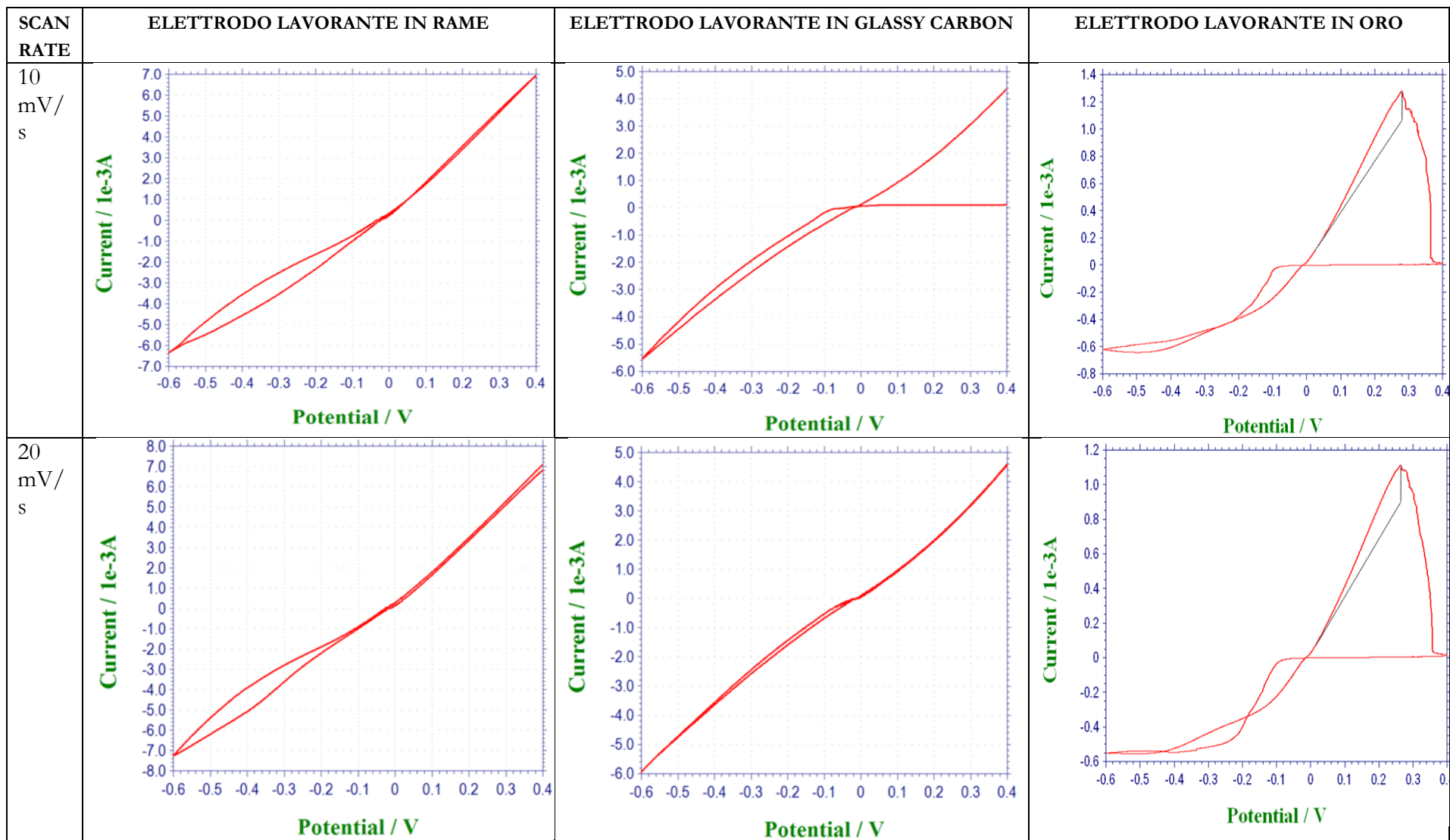
## VOLTAMMOGRAMMI CON ELETTRODO DI RIFERIMENTO IN RAME

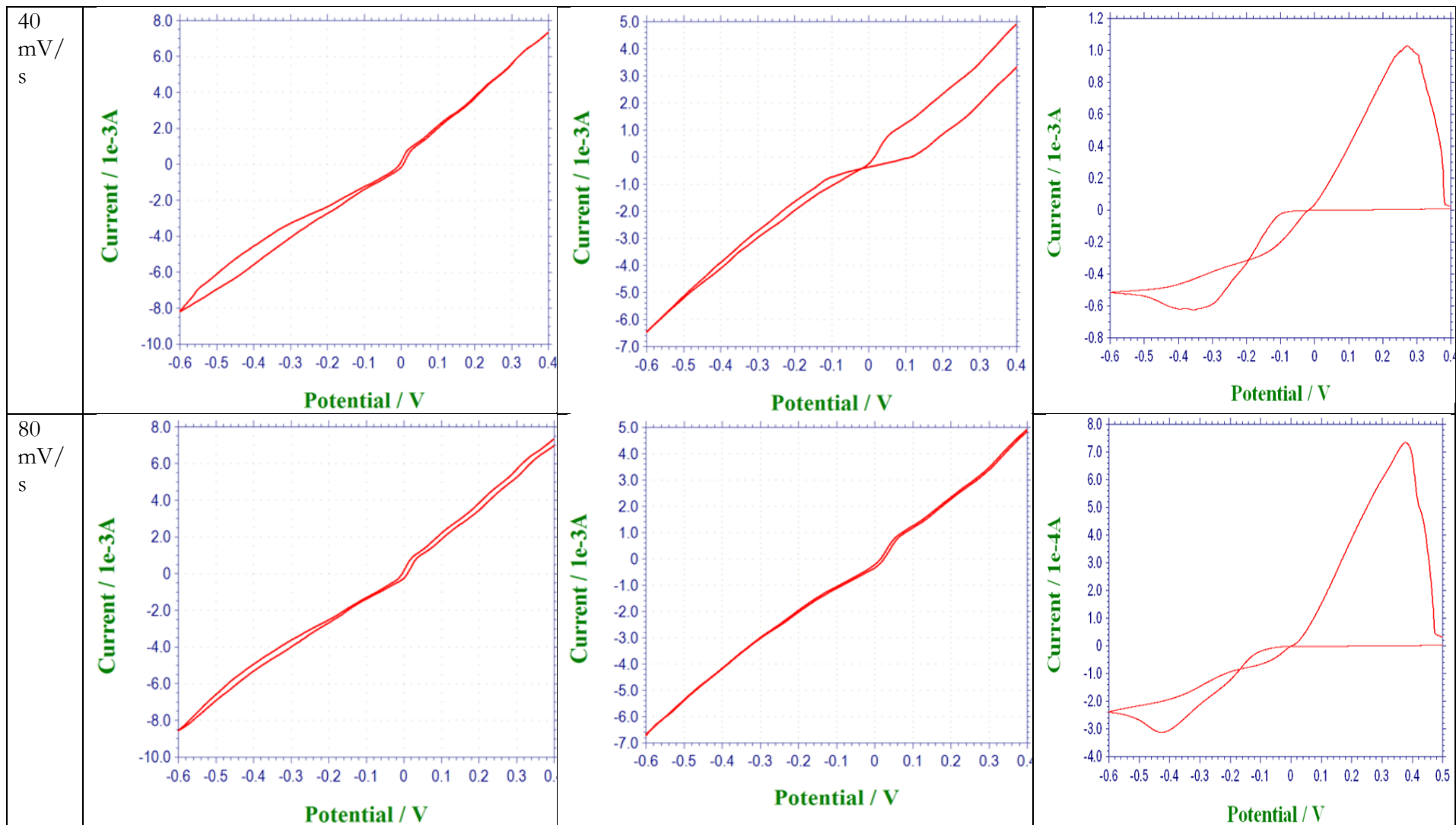
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,6 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 M (Stortini et al., 2015)



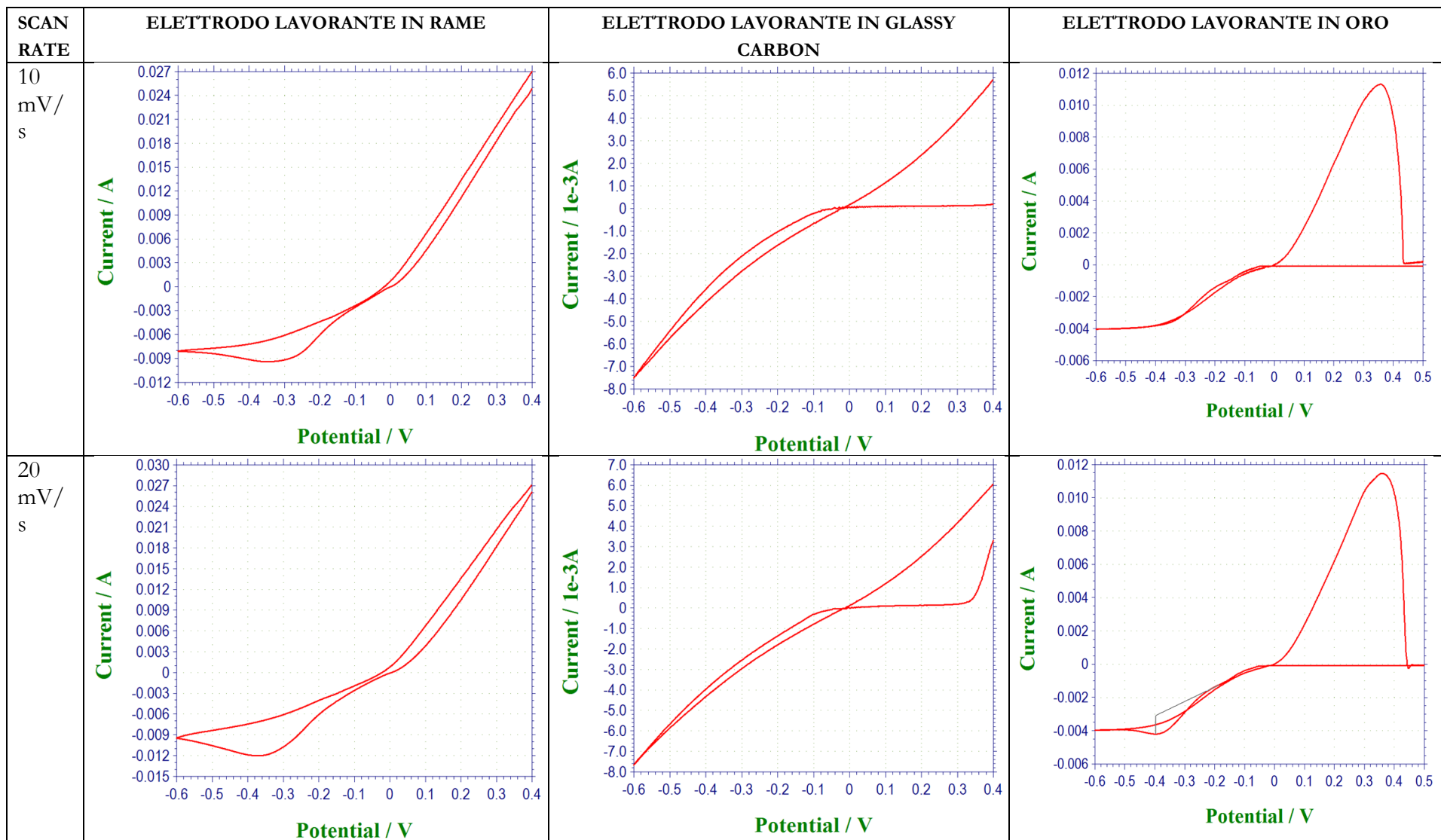


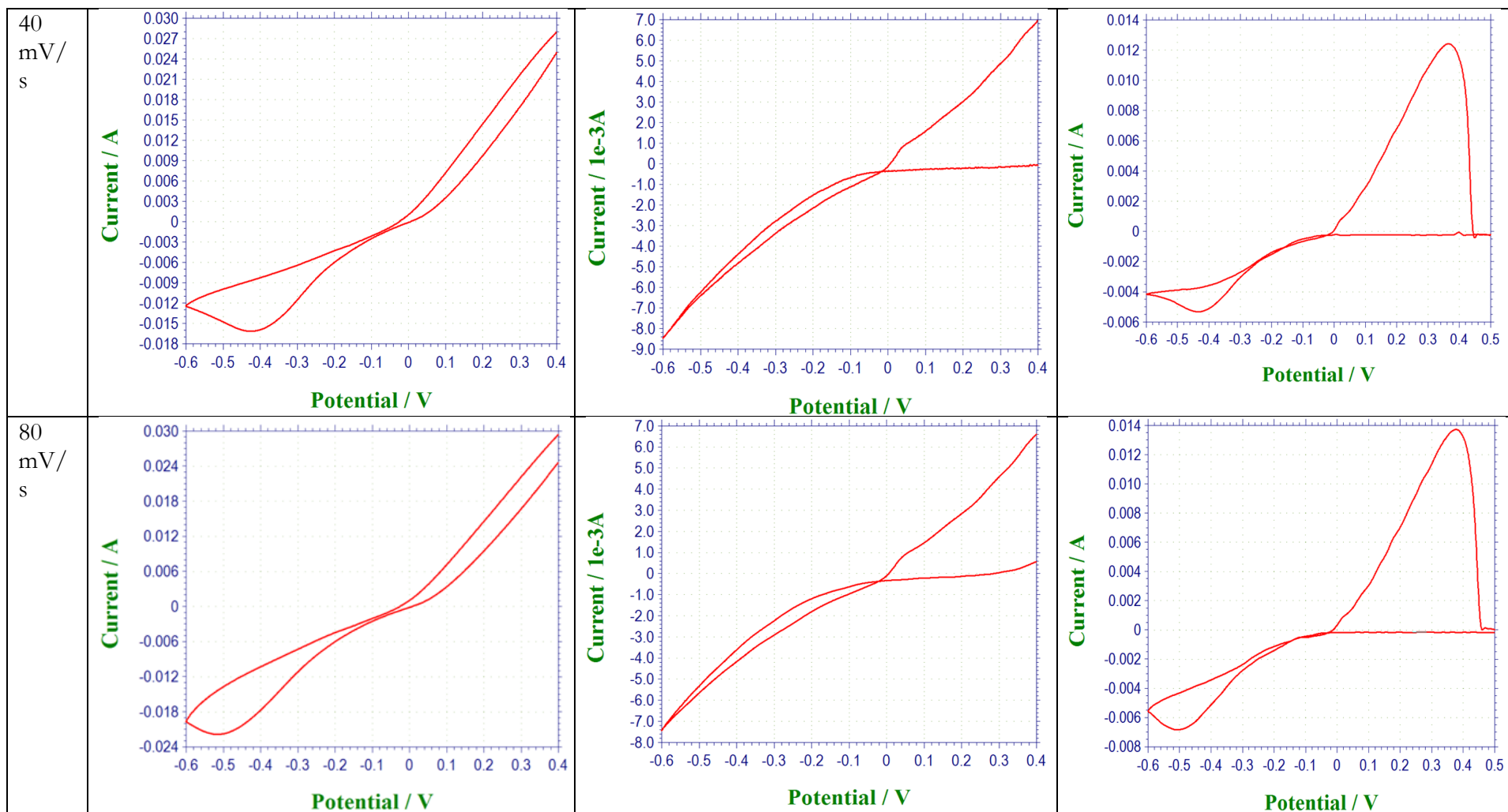
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,6 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 M (Stortini et al., 2015)



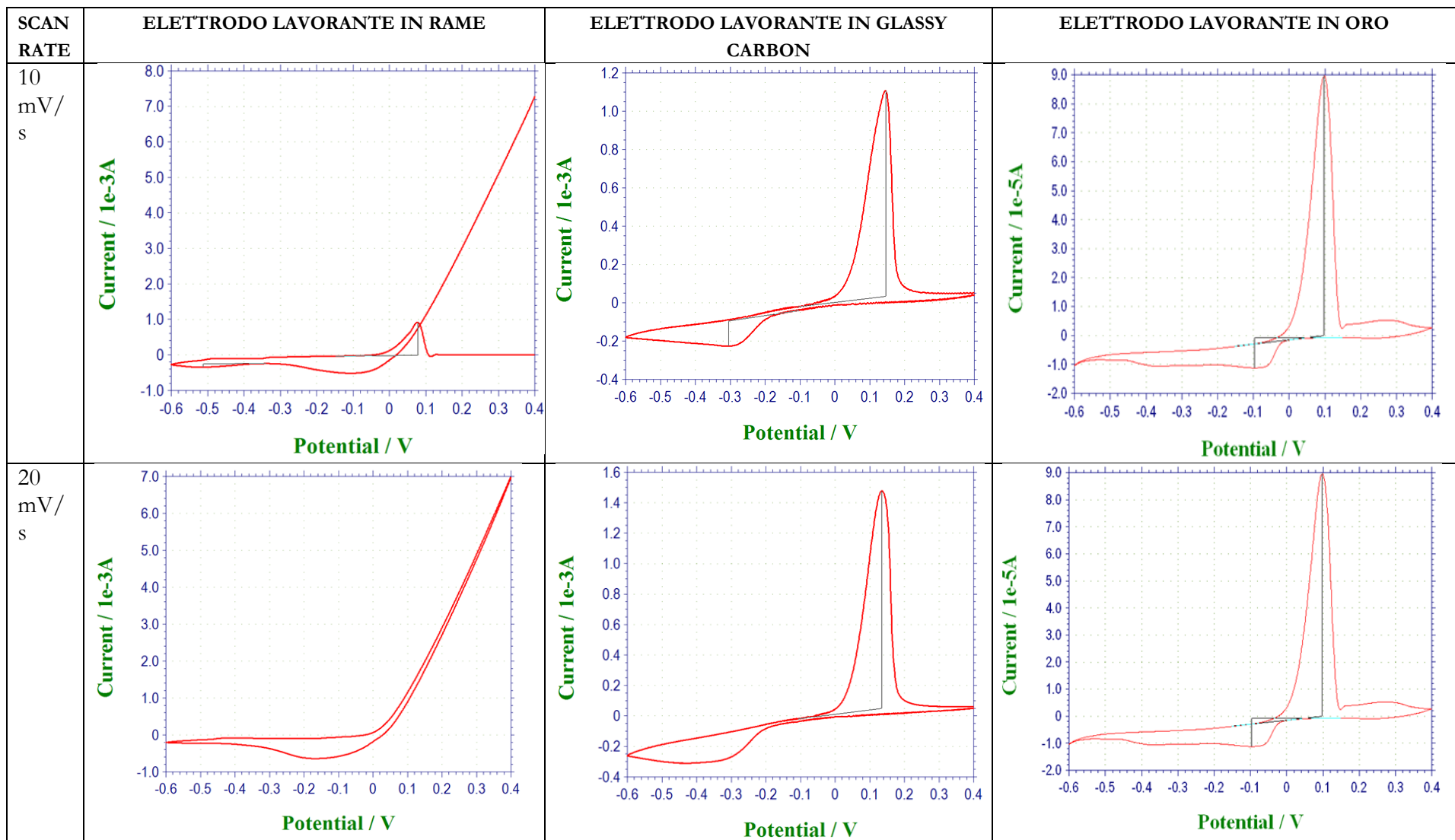


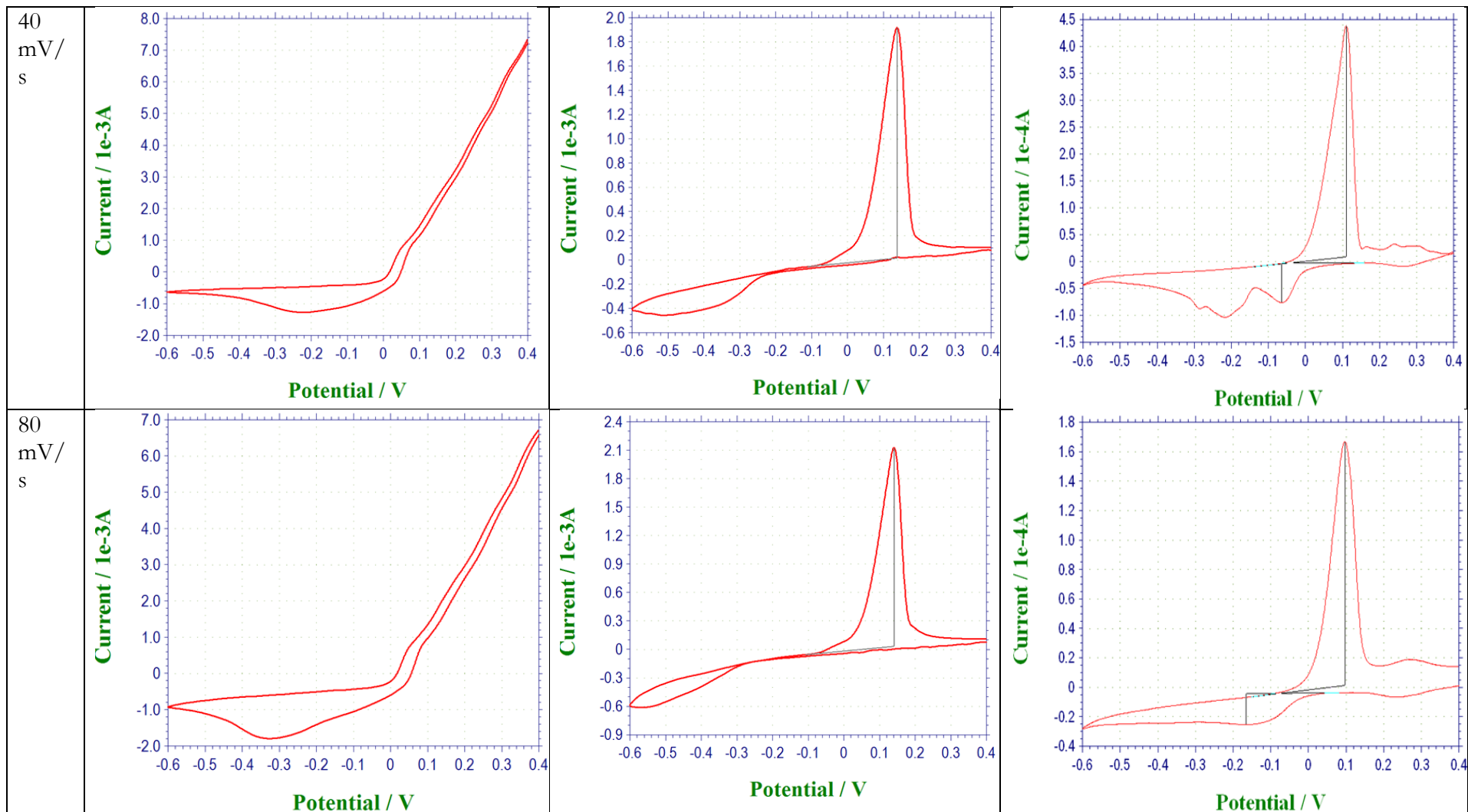
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,88 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,55 M (Gambirasi et al., 2011)





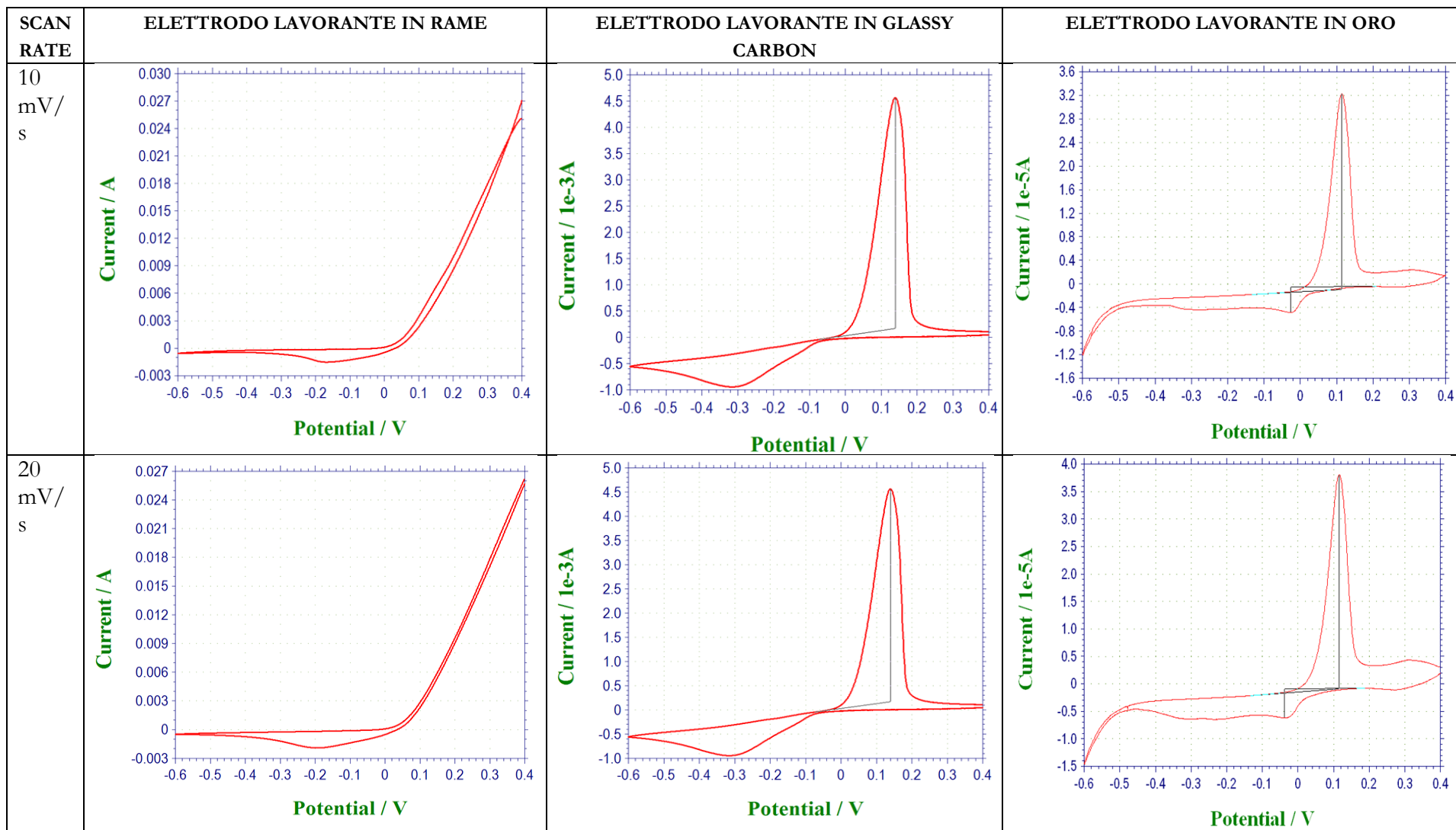
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,05 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  2M (Blanco et al., 2014)

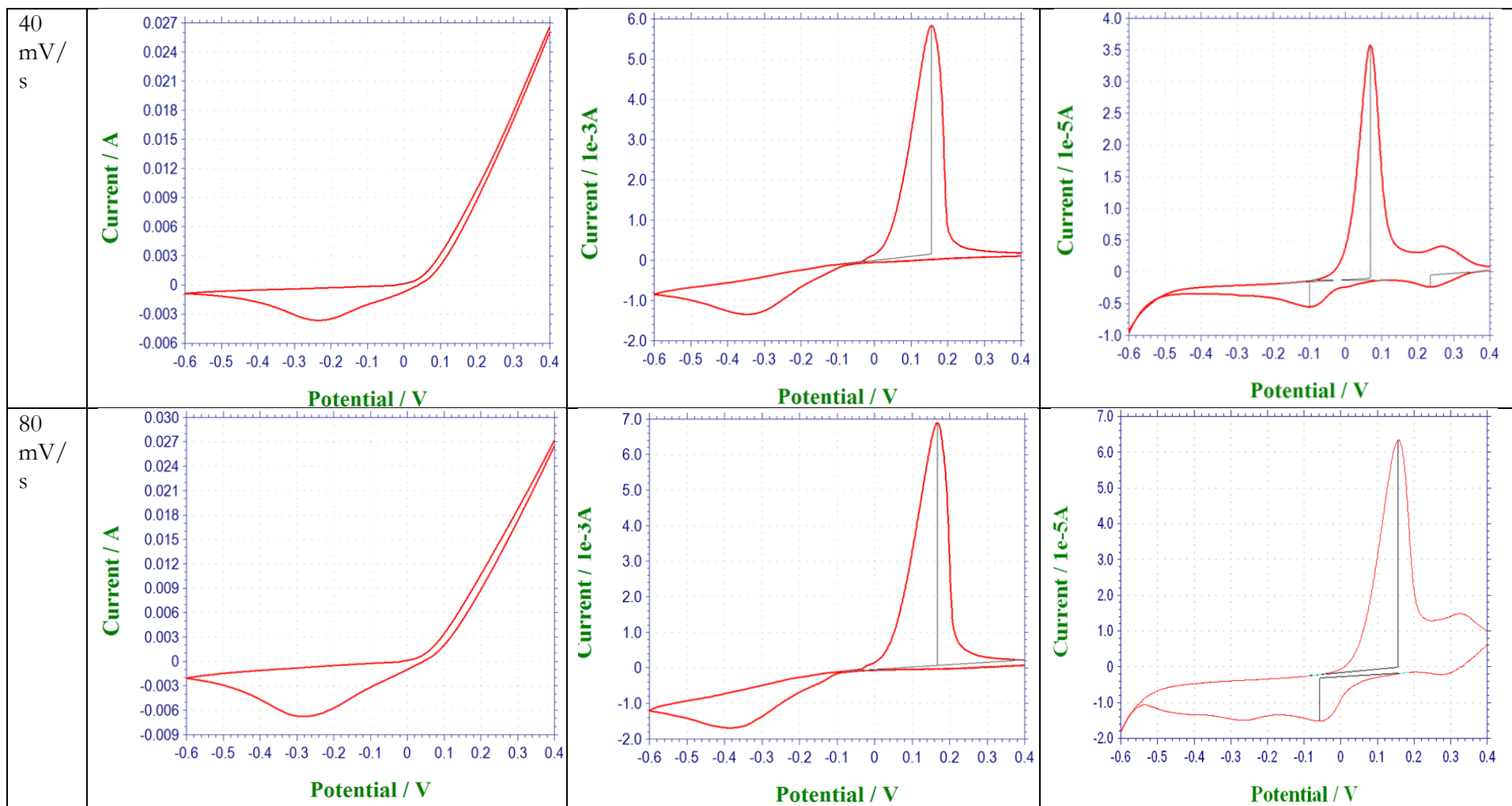




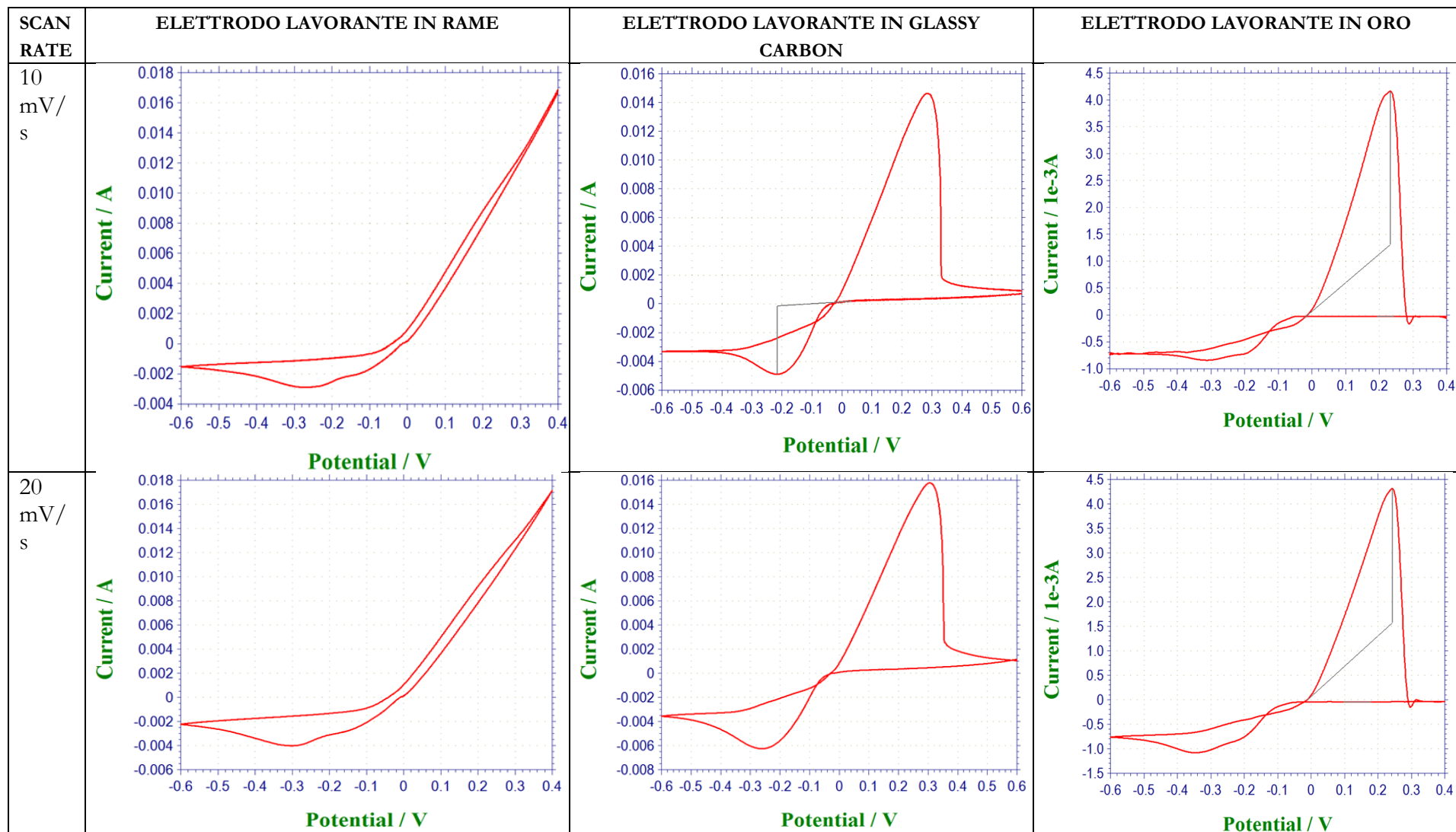


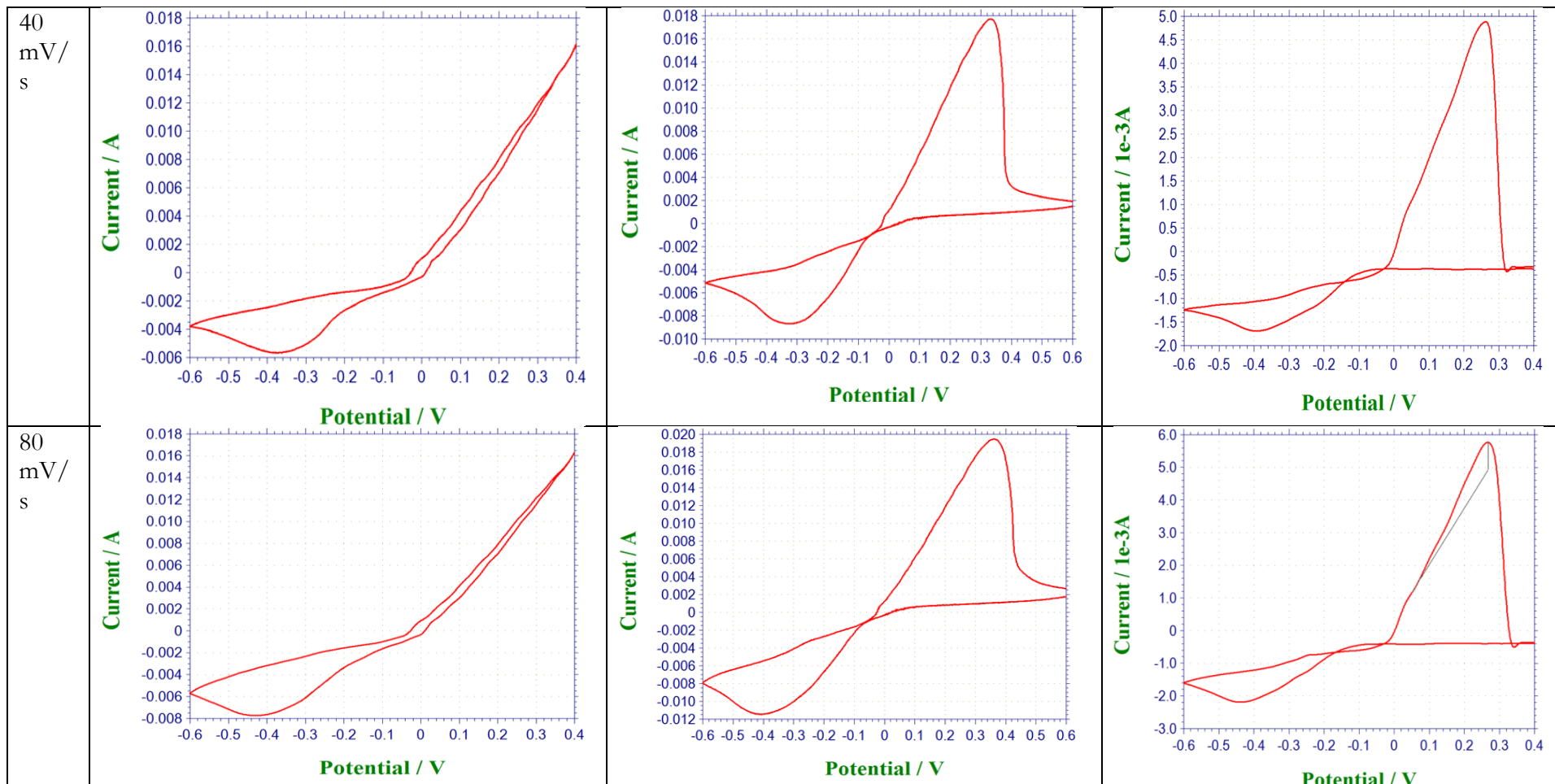
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,01 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 M e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5M





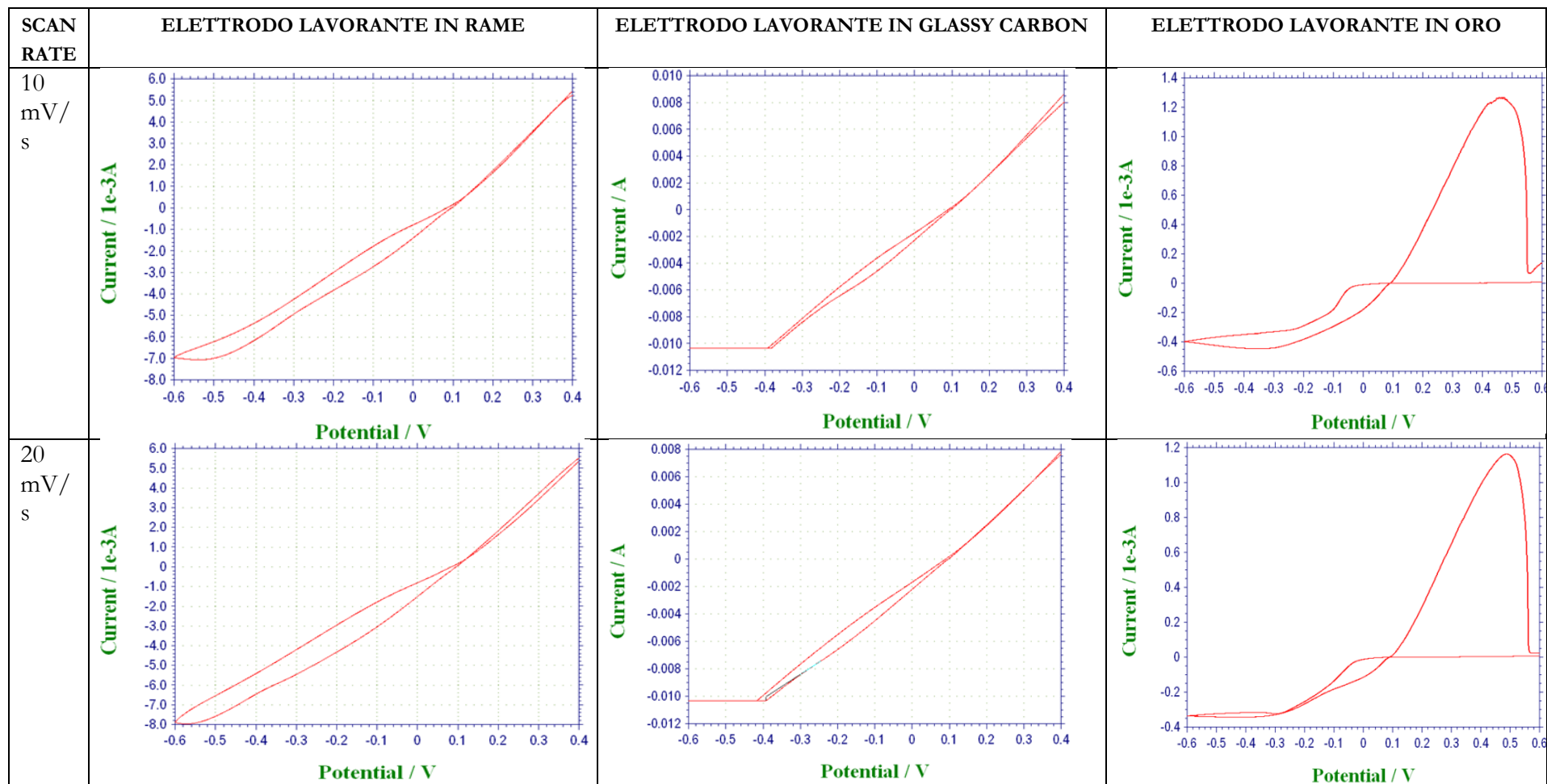
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,3 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 M,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1M

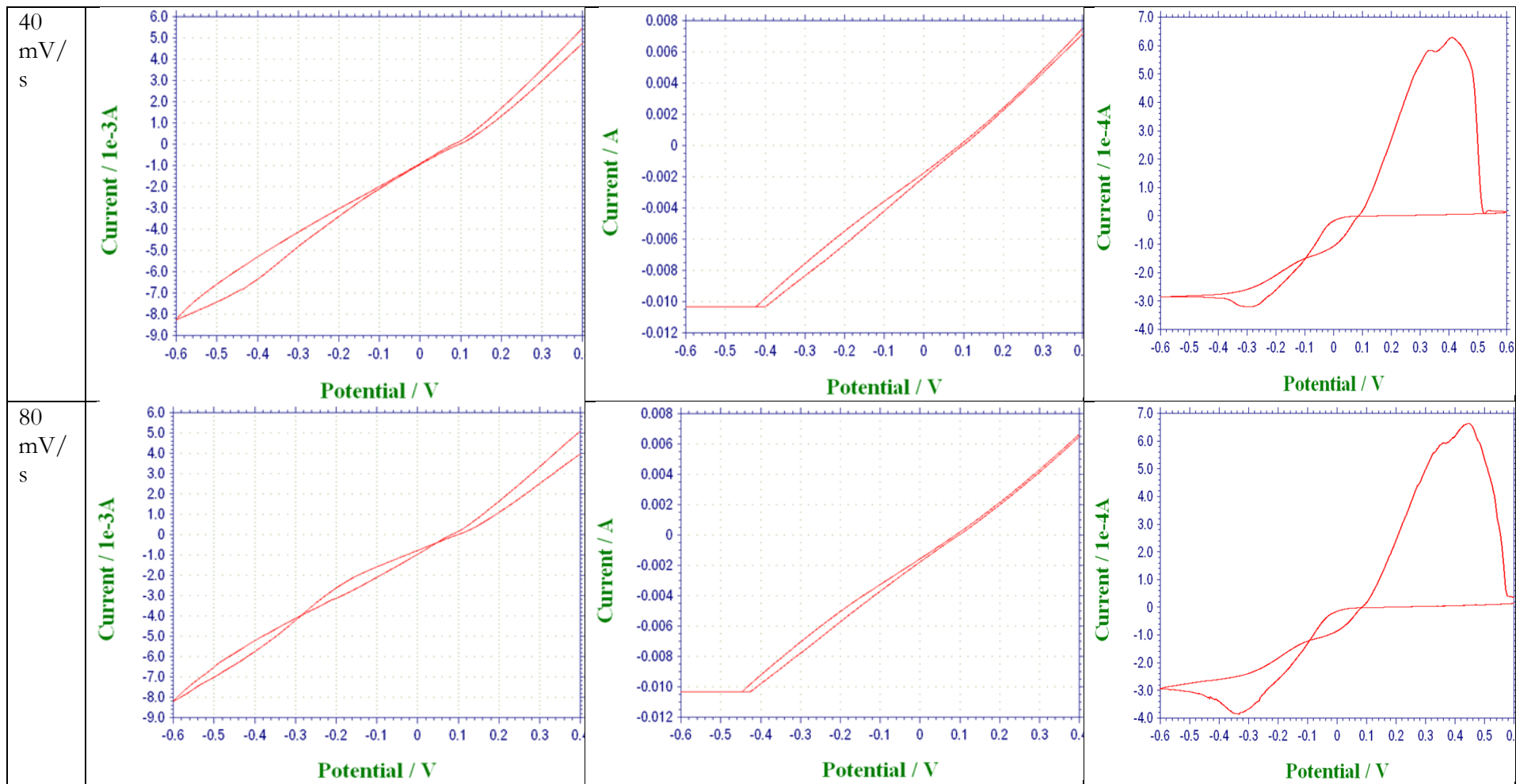




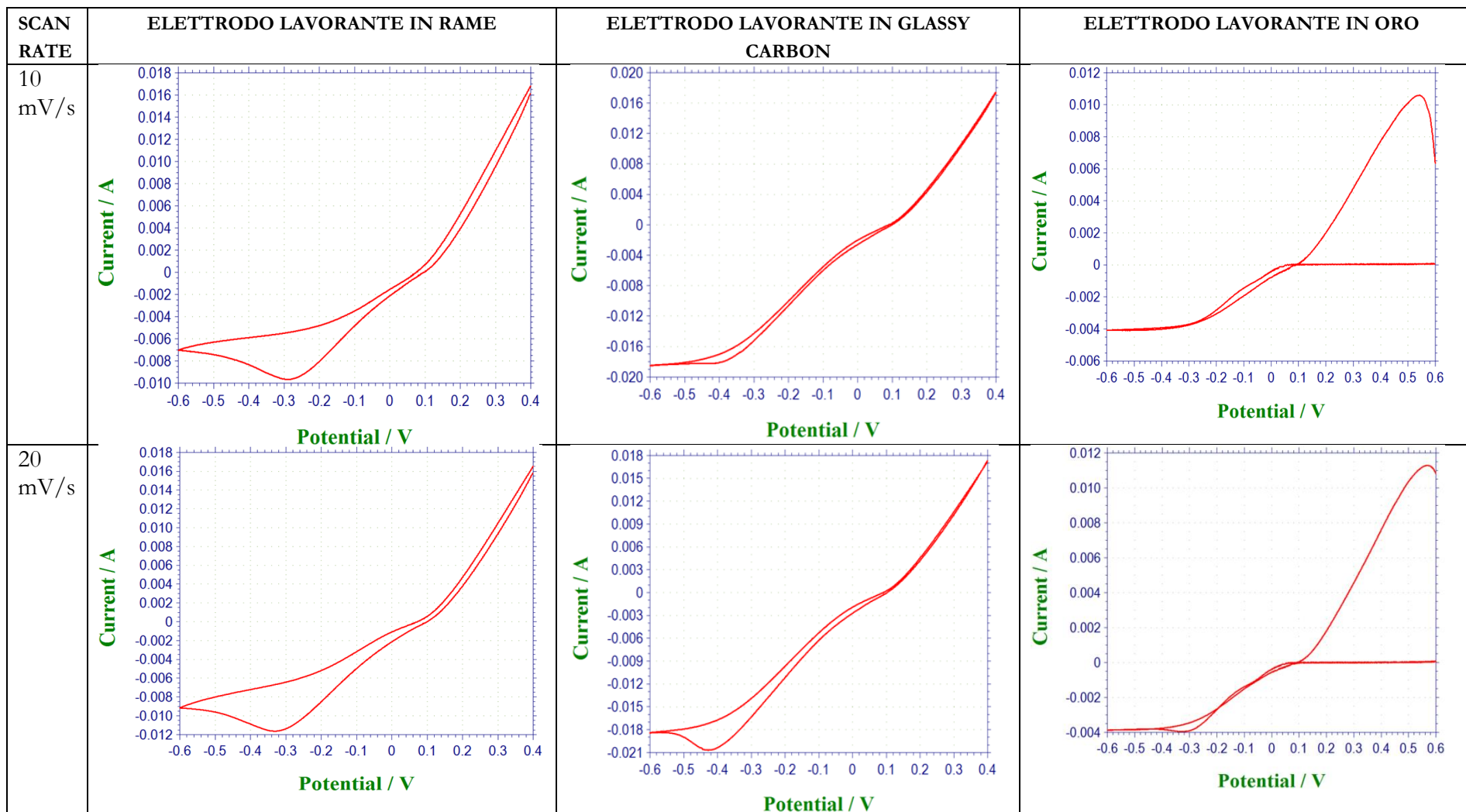
VOLTAMMOGRAMMI CON ELETTRODO DI RIFERIMENTO Ag/AgCl/KCl sat

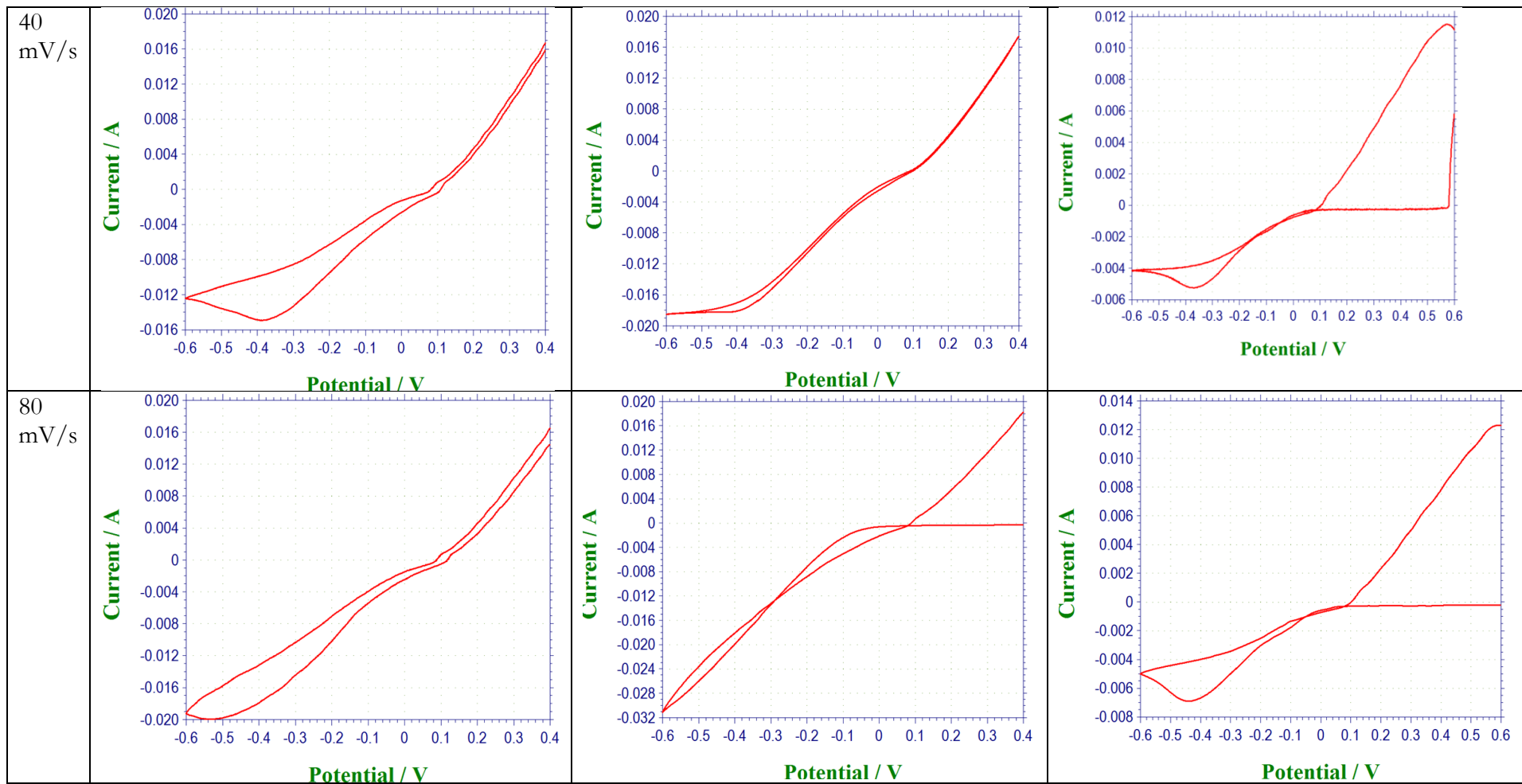
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,6 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 M (Stortini et al., 2015)





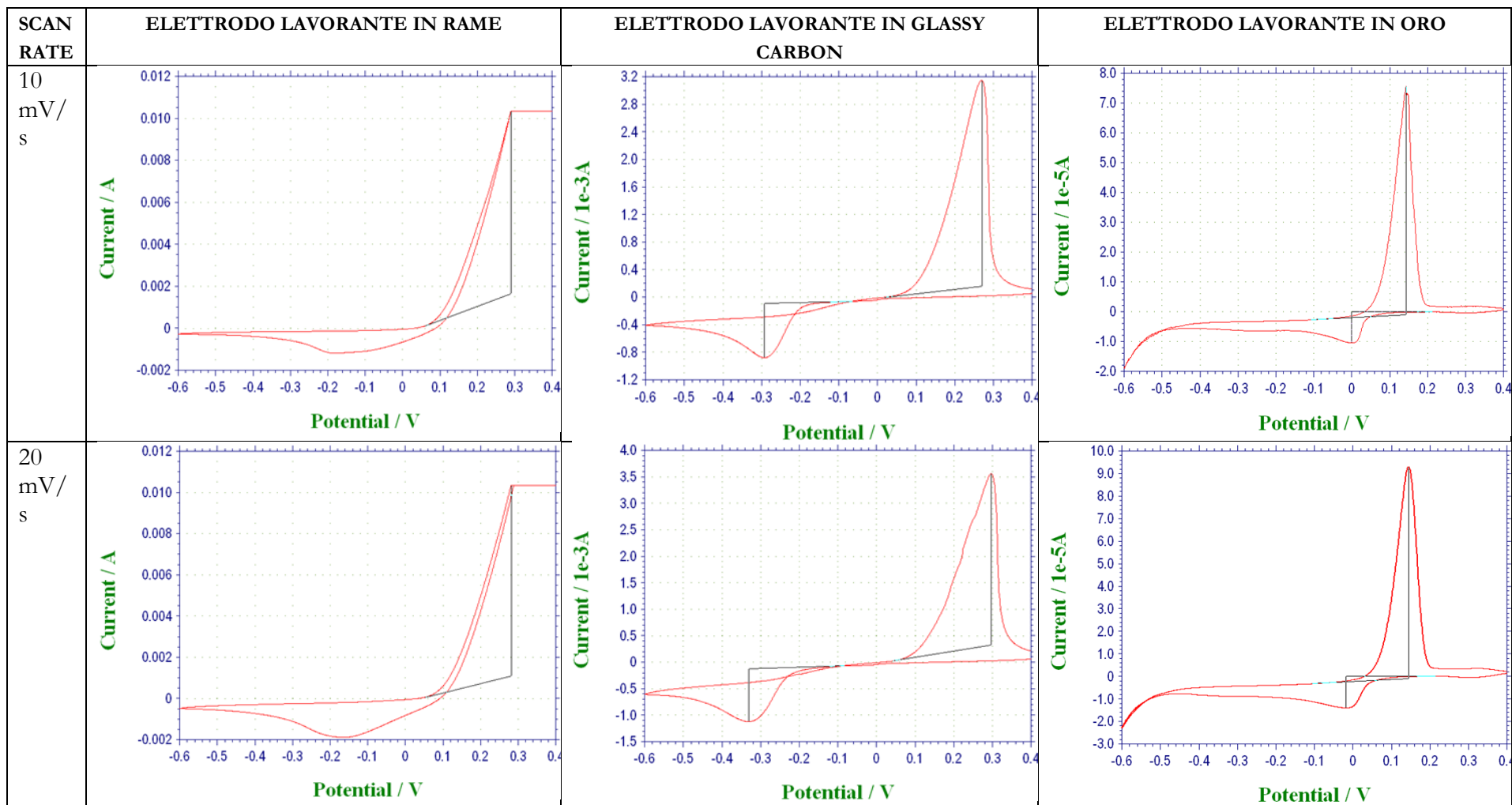
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,88 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,55 M (Gambirasi et al., 2011)

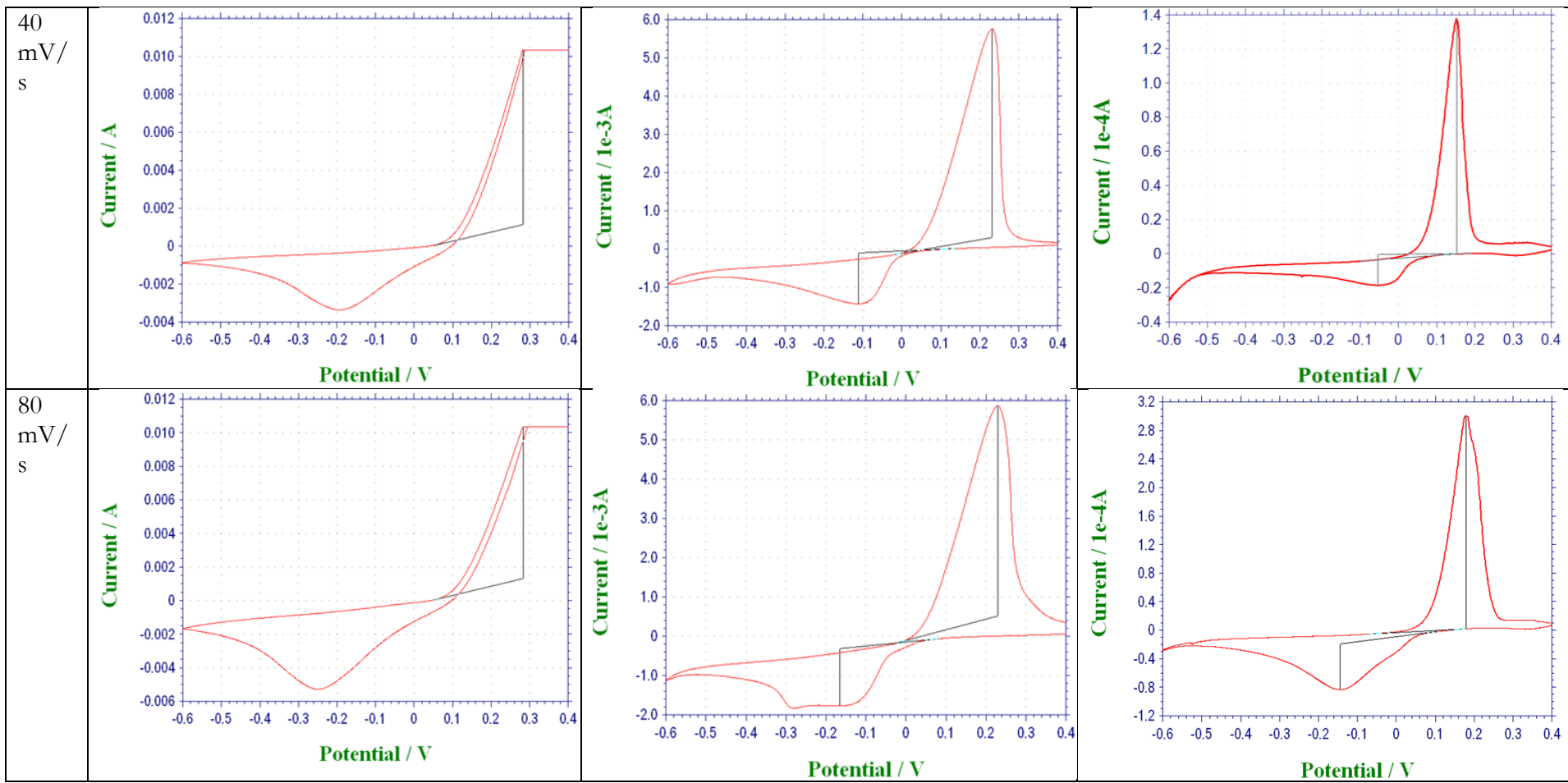




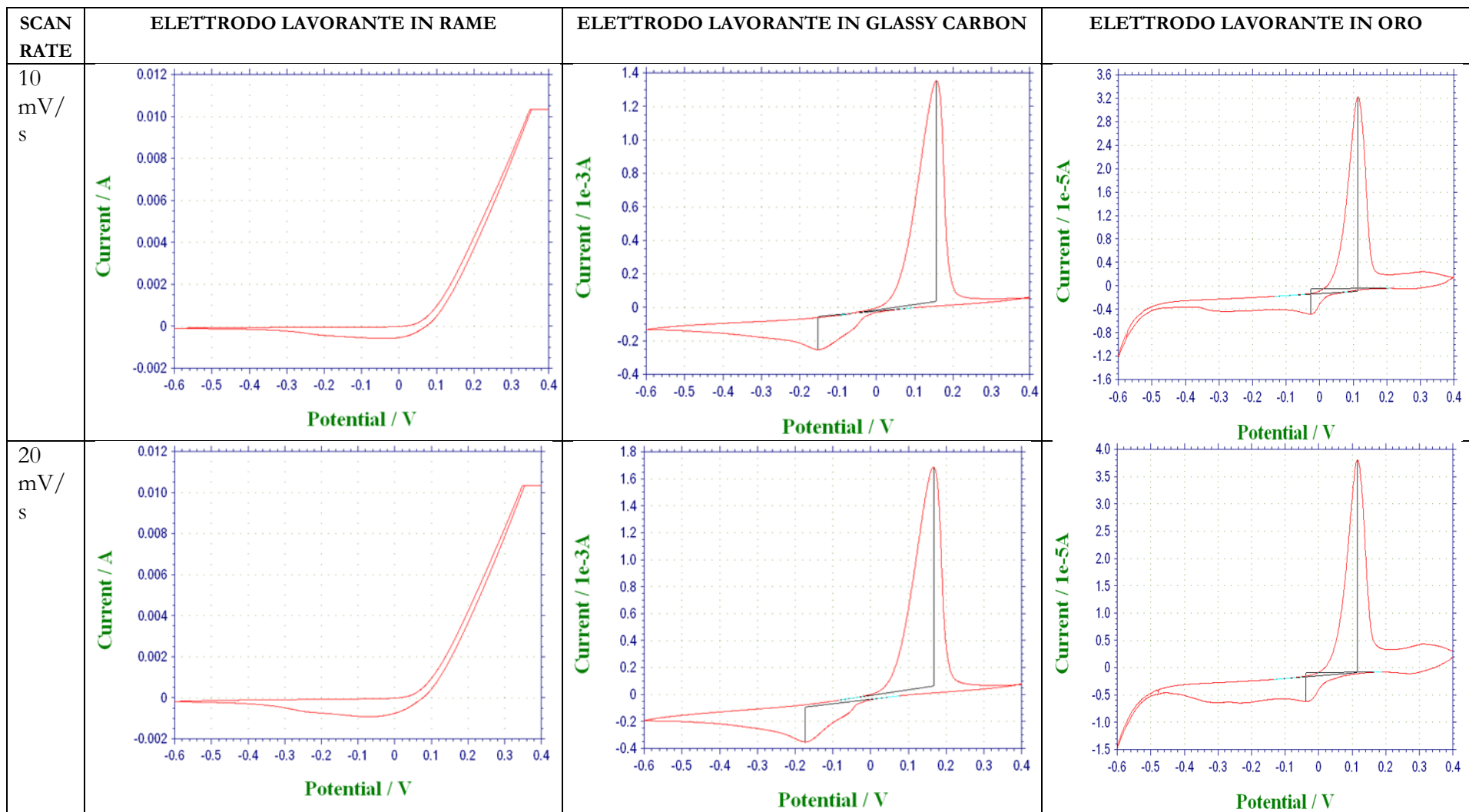


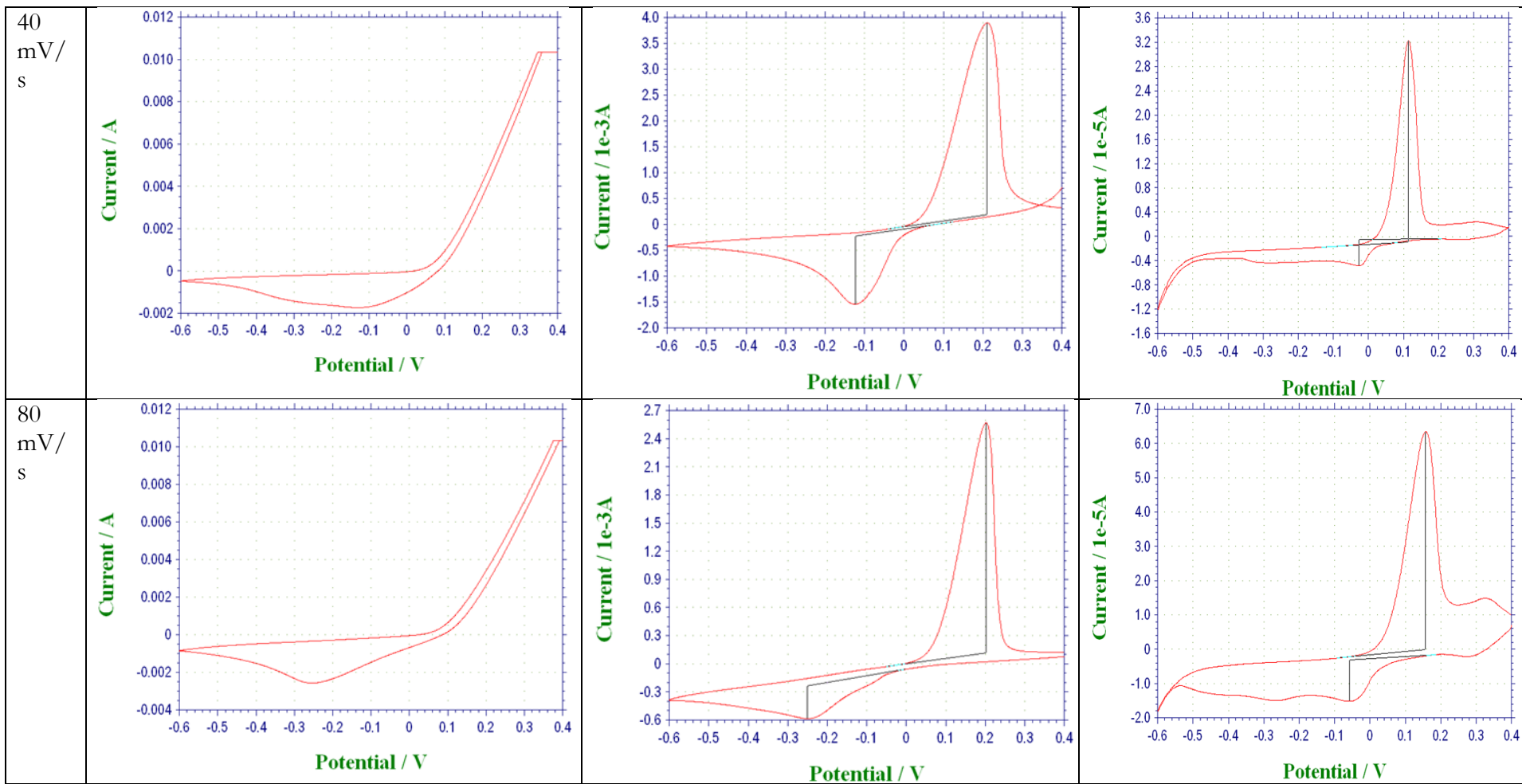
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,05 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  2M (Blanco et al., 2014)



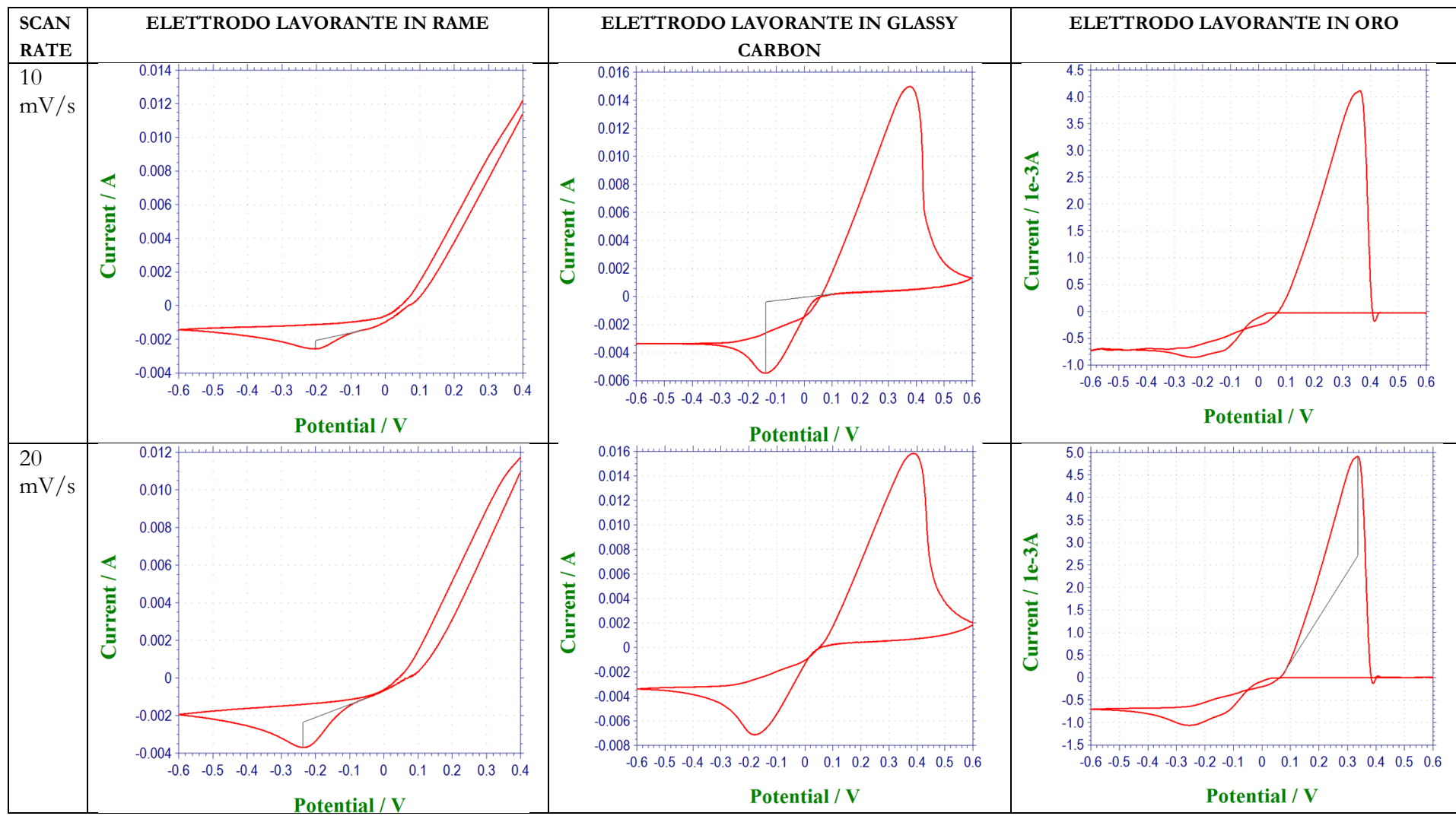


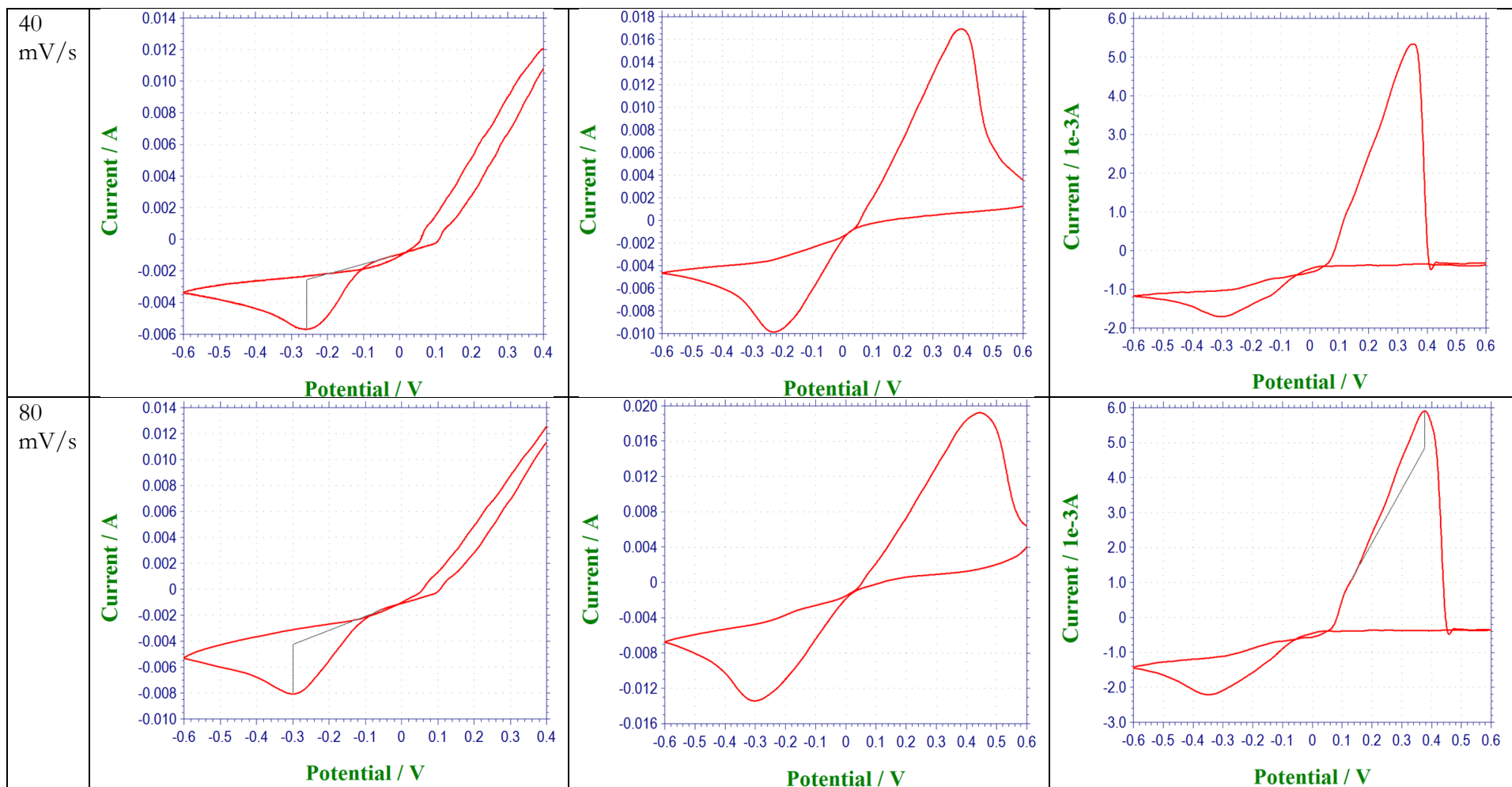
Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,01 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 M e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5M





Soluzione  $\text{CuSO}_4$  0,3 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 M,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1M





ELETTRODO DI RIFERIMENTO IN RAME			Epc (V)			IpC (A)			Ipc/A*Conc (mA/cm <sup>3</sup> *M)			Epa (V)			Ipa (A)		
SOLUZIONE	SALE ELETTROLITA	VELOCITA'	Cu	GC	Au	Cu	GC	Au	Cu	GC	Au	Cu	GC	Au	Cu	GC	Au
CuSO <sub>4</sub> 0,6 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01 M CuNWs	Nessuno	10 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		20 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		40 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		80 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CuSO <sub>4</sub> 0,88 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,55 M	Nessuno	10 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	0.360	ND	ND	1.135e-2
		20 mV/s	ND	ND	-0.197	ND	ND	-5.604e-3	-	-	-186.6	ND	ND	0.360	ND	ND	1.146e-2
		40 mV/s	ND	ND	0.389	ND	ND	-1.691e-3	-	-	-56.3	ND	ND	0.263	ND	ND	4.894e-3
		80 mV/s	ND	ND	-0.492	ND	ND	-2.123e-3	-	-	-70.76	ND	ND	0.267	ND	ND	8.326e
CuSO <sub>4</sub> 0,05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 M	10 mV/s	ND	-0.305	-0.097	ND	-1.327e-4	-1.052e-5	-	-	?	ND	0.146	0.098	ND	1.074e-3	8.973e-5
		20 mV/s	ND	ND	-0.118	ND	ND	-1.315e-5	-	-	?	ND	0.135	0.095	ND	1.427e-3	1.060e-4
		40 mV/s	ND	ND	-0.064	ND	ND	-7.351e-4	-	-	?	ND	0.139	0.110	ND	1.904e-3	4.299e-4
		80 mV/s	ND	ND	-0.166	ND	ND	-2.085e-5	-	-	?	ND	0.141	0.097	ND	2.093e-3	1.655e-4
CuSO <sub>4</sub> 0,01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,001 M	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M	10 mV/s	-0.163	-0.287	-0.081	-1.274e-3	-6.616e-4	-3.230e-6	-1714	-660	?	ND	0.131	0.063	ND	3.324e-3	2.953e-5

		20 mV/s	ND	-0.316	-0.091	ND	-9.499e-4	-4.443e-6	-	-940	-	ND	0.140	0.065	ND	4.398e-3	3.203e-5
		40 mV/s	-0.230	-0.345	-0.100	-3.022e-3	-1.412e-3	-4.217e-6	-4285	-1410	?	ND	0.156	0.069	ND	5.686e-3	3.677e-5
		80 mV/s	-0.280	-0.384	-0.133	-5.049	-1.628e-3	-1.524e-5	-2325	-1620	?	ND	0.168	0.099	ND	6.829e-3	1.023e-4
CuSO <sub>4</sub> 0,3 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,005 M	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M	10 mV/s	-0.275	-0.215	-0.310	-1.392e-3	-4.736e-3	-8.169e-4	-70	-118.4	-81	ND	0.285	0.232	ND	1.468e-2	2.853e-3
		20 mV/s	-0.296	0.260	-0.345	-1.933e-3	-6.711e-3	-1.035e-3	-95	-25.87	-103.5	ND	0.304	0.242	ND	1.581e-2	2.747e-3
		40 mV/s	-0.362	-0.214	-0.391	-2.508e-3	-4.744e-3	-1.327e-3	-125.5	-474	-132.7	ND	0.292	0.260	ND	1.495e-2	4.904e-3
		80 mV/s	-0.430	-0.412	-0.438	-1.967e-3	-1.236e-2	-1.788	-98	-49.2	-1236	ND	0.360	0.267	ND	1.951e-2	8.326e-4

Tabella 1. Tabella riassuntiva delle informazioni ciclovoltammetriche relative alle misure con contro elettrodo in rame.



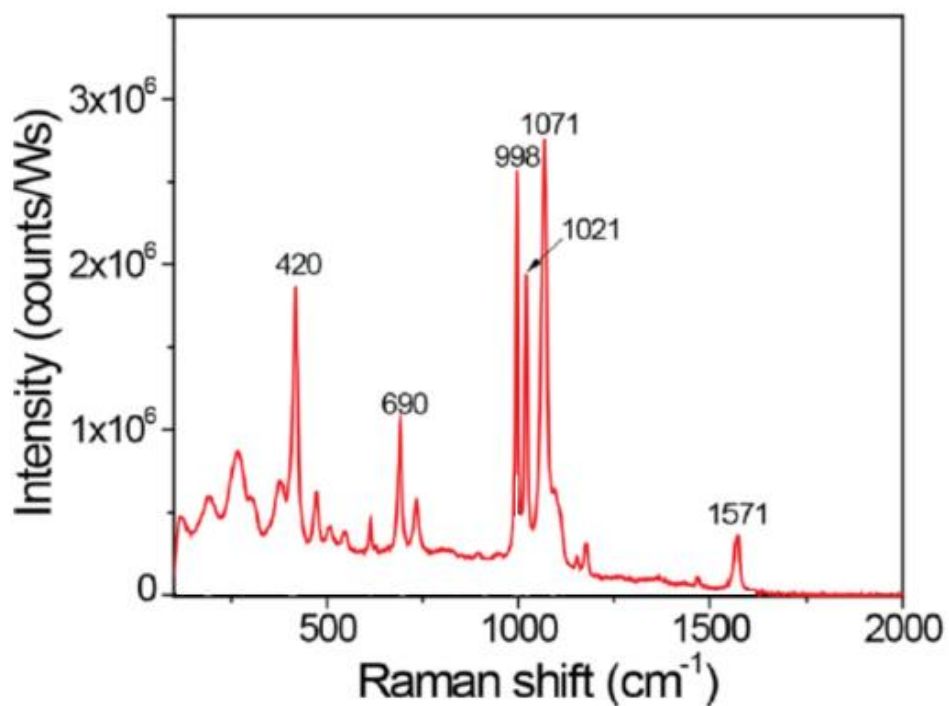
ELETTRODO DI RIFERIMENTO Ag/AgCl/KCl <sub>sat</sub>			E <sub>pc</sub> (V)			I <sub>pC</sub> (A)			I <sub>pc</sub> /A*Conc (mA/cm <sup>3</sup> *M)			E <sub>pa</sub> (V)			I <sub>pa</sub> (A)		
SOLUZIONE	SALE ELETTROLITA	VELOCITA'	Cu	GC	Au	Cu	GC	Au	Cu	GC	Au	Cu	GC	Au	Cu	GC	Au
CuSO <sub>4</sub> 0,6 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01 M CuNWs	Nessuno	10 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		20 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		40 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		80 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CuSO <sub>4</sub> 0,88 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,55 M	Nessuno	10 mV/s	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		20 mV/s	ND	ND	-0.321	ND	ND	-3.950e-3	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		40 mV/s	ND	ND	-0.368	ND	ND	-4.974e-3	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		80 mV/s	ND	ND	-0.439	ND	ND	-6.630e-3	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CuSO <sub>4</sub> 0,05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 M	10 mV/s	ND	-0.293	0.000	ND	-7.938e-4	-1.040e-5	-	-	131.6	ND	0.270	0.143	ND	2.988e-3	7.671e-5
		20 mV/s	-0.162	-0.331	-0.018	-1.606e-3	-9.904e-4	-1.399e-5	-	-	53.33	ND	0.297	0.145	ND	3.238e-3	9.904e-4
		40 mV/s	-0.191	-0.112	-0.053	-2.499e-3	-1.338e-3	-1.818e-5	-	-	83.06	ND	0.232	0.153	ND	5.459e-3	1.378e-4
		80 mV/s	-0.251	-0.165	-0.144	-3.594e-3	-1.448e-3	-6.400e-5	-	-	11.96	ND	0.230	0.180	ND	5.358e-3	2.988e-4
CuSO <sub>4</sub> 0,01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,001M	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M	10 mV/s	ND	-0.152	ND	-0.027	-1.964e-4	-4.375e-6	-	-190	-	ND	0.157	0.114	ND	1.318e-3	3.324e-5
		20 mV/s	ND	-0.174	ND	-0.038	-2.611e-4	-5.343e-6	-	-260	-	ND	0.167	0.116	ND	1.625e-3	3.901e-5

		40 mV/s	ND	-0.123	ND	-0.053	-1.325e-3	-6.710e-6	-	-1325	-	ND	0.211	0.117	ND	3.702e-3	4.482e-5
		80 mV/s	ND	-0.251	-0.057	ND	-3.479e-4	-0.1201e-5	-	-350	-	ND	0.202	0.157	ND	2.452e-3	6.358e-5
CuSO <sub>4</sub> 0,3 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,005M	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M	10 mV/s	-0.202	-0.136	-0.230	-4.825e-4	-5.088e-3	-8.331e-4	-24.12	-127.2	-83.3	ND	0.375	0.355	ND	1.504e-2	4.114e-3
		20 mV/s	-0.236	-0.180	-0.253	-1.351e-3	-7.484e-3	-1.058e-3	-67.55	-187.1	-103.8	ND	0.387	0.335	ND	1.588e-2	2.203e-3
		40 mV/s	-0.257	-0.227	-0.302	-3.153e-3	-1.100e-2	-1.303e-3	-15.7.65	-275	-130.3	ND	0.393	0.350	ND	1.703e-2	5.370e-3
		80 mV/s	-0.299	-0.301	-0.346	-3.834e-3	-1.334e-2	-1.810e-3	-19.1.7	-333.5	-181	ND	0.445	0.377	ND	1.929e-2	1.053e-3

Tabella 2. Tabella riassuntiva delle informazioni ciclovoltammetriche relative alle misure con contro elettrodo Ag/AgCl/KCl sat

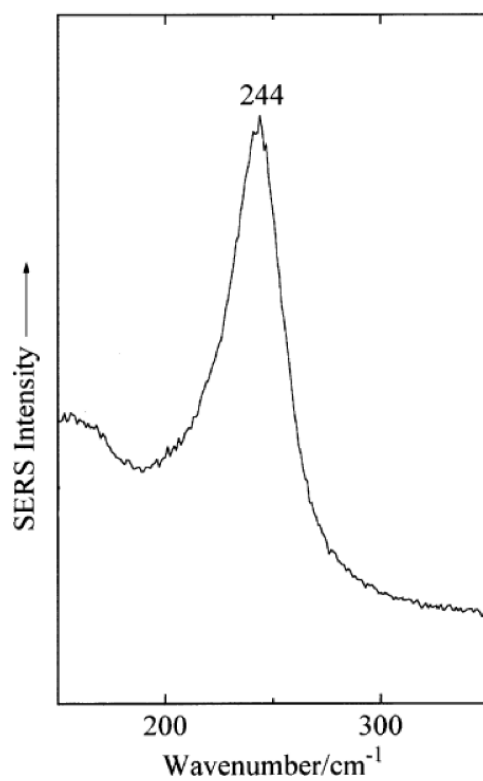
## APPENDICE C: Spettri Raman di riferimento dalla letteratura

A) Benzenziolo (Fontana et al., 2013)



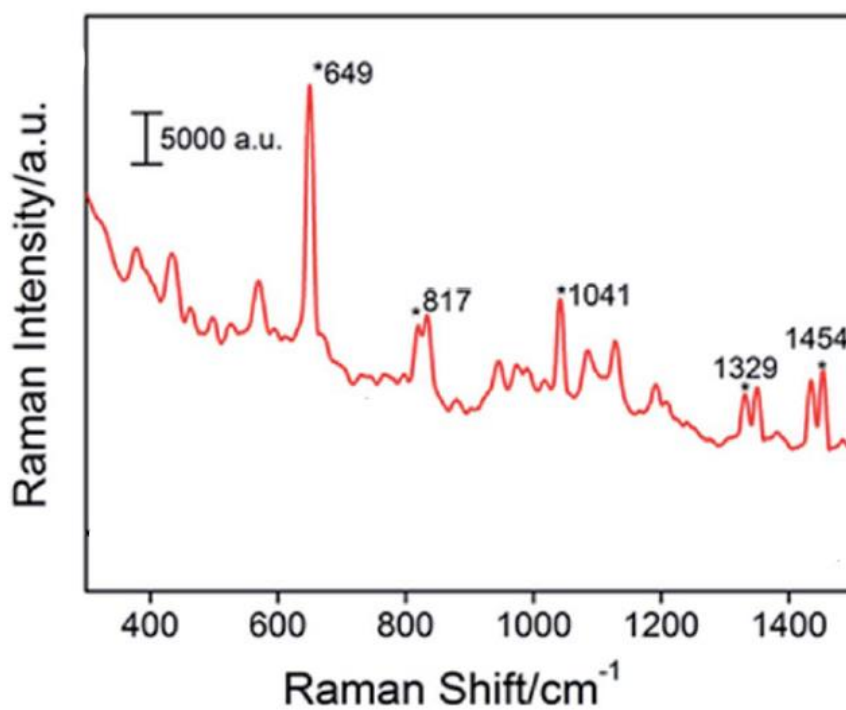
Lo spettro del benzenziolo (acquisito a  $\lambda = 785$  nm) mostra i segnali Raman di questa molecola, generati dalle vibrazioni prodotte dalla deformazione dell'anello benzenico (in-plane e out-of-plane) e da stretching e bending simmetrico ed asimmetrico dei legami C-C, C-H e C-S.

B) AgNSs (Sanchez-Cortés et Garcia-Ramos, 1998)



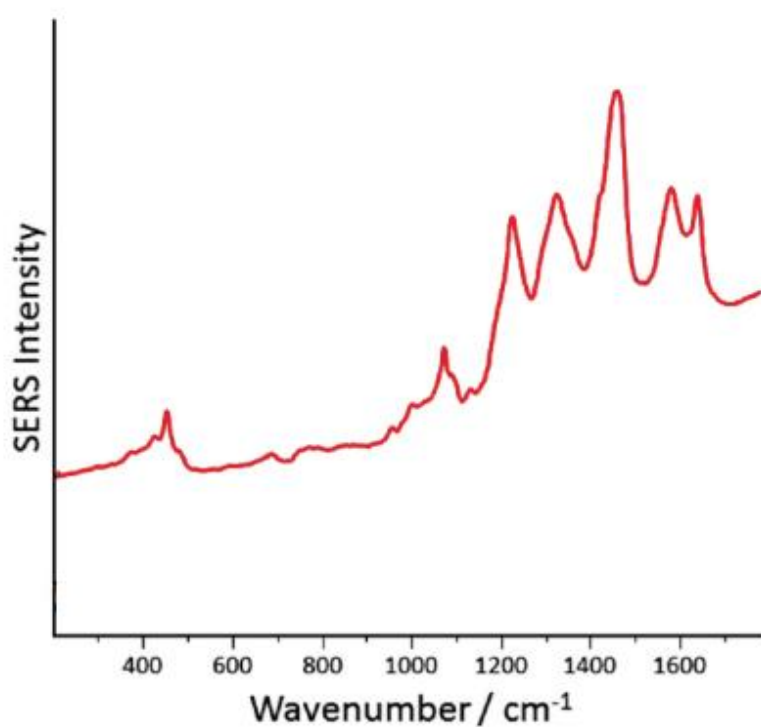
Lo spettro Raman del colloide d'argento (acquisito a  $\lambda=785$  nm) presenta un unico picco che cade tra i  $230\text{-}240\text{ cm}^{-1}$  ed è dovuto allo stretching del legame fra il metallo e l'adsorbato,  $\nu(\text{Ag-adsorbato})$ .

C) Cisteamina (Ma et al., 2016)



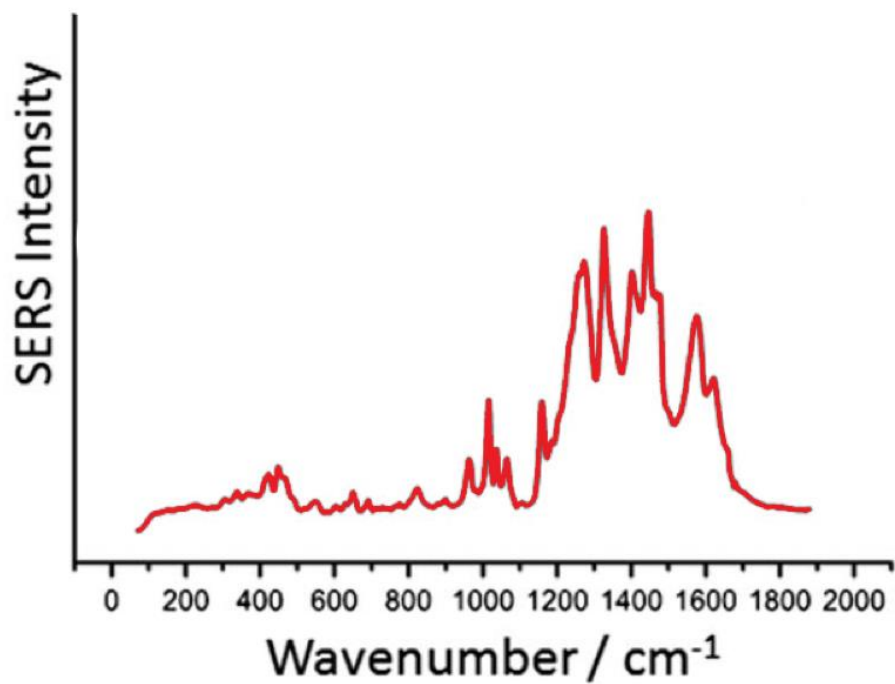
Lo spettro Raman della cisteamina si contraddistingue per il picco principale a 649 cm<sup>-1</sup>, associato ad altri di minore intensità. Tutti i segnali sono dovuti alle diverse vibrazioni dei legami C-C, C-H, S-H ed N-H presenti in questa molecola.

D) Rosso Carminio (Pozzi et Leona, 2016)



Lo spettro del carminio, i cui segnali sono attribuibili all'acido carminico, si contraddistingue per una serie di segnali che cadono fra 1000 e 1800 cm<sup>-1</sup>, fra cui il picco principale e notoriamente di maggiore intensità risulta quello che cade intorno a 1400 cm<sup>-1</sup>. Questi segnali sono dovuti allo stretching ed al bending simmetrici e non dei gruppi funzionali e della molecola di zucchero che contraddistinguono la struttura chimica dell'acido carminico.

E) Lacca di garanza (Pozzi et Leona, 2016)



I segnali Raman nello spettro della lacca di garanza sono dovuti essenzialmente all'alizarina, la molecola colorante presente in maggior abbondanza nel colorante. I principali picchi della lacca si collocano fra 900 e 1600 cm<sup>-1</sup> e sono dovuti allo stretching ed al bending simmetrici e non dei gruppi funzionali presenti.

## BIBLIOGRAFIA

Albrecht M.G., Creighton J.A., Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode, *J. American. Soc.*, 1977, 99, 5215-5217.

Aroca R., Battisti D., Kovacs G.J., Loutfy R.O., Surface Enhanced Raman Scattering of Molecular Dyes Adsorbed on Metal Surfaces, *J. Electrochem. Soc.*, 1989, 136, 2902-2905.

Ball P., COLORE. UNA BIOGRAFIA. Tra arte, storia e chimica la bellezza e i misteri del mondo del colore, Rizzoli, 2001.

Blanco S., Vargas R., Mostany J., Borràs C., Scharifker B.R., Modeling the growth of nanowire arrays in porous membrane templates, *J. Electrochem Soc.*, 2014, 161, E3341-E3347.

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, *J. Raman Spectrosc.*, 2011, 42, 1305-1310.

Brosseau C.L., Gambardella A., Casadio F., Grzywacz C.M., Wouters J., Van Duyne R.P., Ad-hoc surface-enhanced Raman spectroscopy methodologies for the detection of artist dyestuffs: thin layer chromatography-surface enhanced Raman spectroscopy and in situ on the fiber analysis. *Anal. Chem.*, 2009, 81, 3056-3062.

Brosseau C.L., Rayner K.S., Casadio F., Grzywacz C.M., Van Duyne R.P., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A Direct Method to Identify Colorants in Various Artist Media, *Anal. Chem.* 2009, 81, 7443-7447.

Bruni S., Guglielmi V., Pozzi F., Historical organic dyes: a surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectral database on Ag Lee–Meisel colloids aggregated by NaClO<sub>4</sub>, *J. Raman Spectrosc.*, 2011, 42, 1267-1281.



Canamares M.V., Garcia-Ramos J.V., Domingo C., Sanchez-Cortes S., Surface-enhanced Raman scattering study of the adsorption of the anthraquinone pigment alizarin on Ag nanoparticles, *J. Raman Spectrosc.*, 2004, 35, 921-927.

Canamares M.V., Garcia-Ramos J.V., Domingo C., Sanchez-Cortes S., Vibrational Spectroscopy 2006, 40, 161-167.

Canamares M.V., Leona M., Surface-enhanced Raman scattering study of the red dye laccaic acid, *J. Raman Spectrosc.*, 2007, 38, 1259-1266.

Casadio F., Leona M., Lombardi J.R., Van Duyne R., Identification of organic colorants in fibers, paints, and glazes by surface enhanced Raman spectroscopy *Acc. Chem. Res.*, 2010, 43, 782-791.

Chen K., Leona M., Vo-Dinh K.C., Yan F., Wabuye M.B., Vo-Dinh T., Application of surface-enhanced Raman scattering (SERS) for the identification of anthraquinone dyes used in works of art, *J. Raman Spectrosc.*, 2006, 37, 520-527.

Chen K., Leona M., Vo-Dinh T., Surface-enhanced Raman scattering for identification of organic pigments and dyes in works of art and cultural heritage material, *Sensor Rev.*, 2007, 27, 109-120.

Chen K., Vo-Dinh K.C., Yan F., Wabuye M.B., Vo-Dinh T., Direct identification of alizarin and lac dye on painting fragments using surface-enhanced Raman scattering, *Anal Chem Acta*, 2006, 569, 234-237.

De Leo M., Pereira F.C., Moretto L.M., Scopece P., Polizzi S., Ugo P., Towards a Better Understanding of a Gold Electroless Deposition in Track-Etched Templates, *Chem. Mater.*, 2007, 19, 5955-5964.

Doherty B., Brunetti B.G., Sgamellotti A., Miliani C., A detachable SERS active cellulose film: a minimally invasive approach to the study of painting lakes, *J. Raman Spectrosc.*, 2011, 42, 1932-1938.

Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J., Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem. Phys. Lett.*, 1974, 26, 163-166.

Garcia-Leis A., Garcia-Ramos J.V., Sanchez-Cortes S., Silver Nanostars with High SERS Performance, *J. Phys. Chem. C*, 2013, 117, 7791-7795.

Gambirasi A., Cattarin S., Musiani M., Vazquez-Gomez L., Verlatto E., Direct electrodeposition of metal nanowires on electrode surface, *Electrochimica Acta*, 2011, 56, 8582-8588

Guerrini L., Jurasekova Z., Domingo C., Campos-Vallette M., Garcia-Ramos J.V., Sanchez-Cortes S., Importance of metal-adsorbate interactions for the surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on plasmonic nanoparticles, *Plasmonics*, 2007, 2, 147-156.

Guineau B., Guichard V. in ICOM Committee for Conservation: 8th Triennial Meeting, Vol.2, The Getty Conservation Institute, Marina Del Ray, CA, 1987, 659.

Hofenk de Graaff J.H., The colourful past. Origins, chemistry and identification of natural dyestuffs, Archetype Publications, London, 2004.

Hoft R.C., Ford M.J., McDonagh A.M., Cortie M.B., Adsorption of Amine Compounds on the Au(111) Surface: A Density Functional Study, *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111, 1386-1389.

Hulteen J.C., Jirage K.B., Martin C.R., Introducing Chemical Transport Selectivity into Gold Nanotubule Membranes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 6603-6604.

Idone A., Aceto M., Diana E., Appolonia L., Gulmini M., Surface-enhanced Raman scattering for the analysis of red lake pigments in painting layers mounted in cross sections, *J. Raman Spectrosc.*, 2014.

Jake Fontana, J., Livenere J., Bezares F.J., Caldwell J.D., Rendell R., Ratna B.R., Large surface-enhanced Raman scattering from self-assembled gold nanosphere monolayers, *Appl. Phys. Lett.*, 2013, 102, 201606.

Jeanmaire D.J., Van Duyne R.P., Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *J. Electroanal. Chem. Interfacial electrochem.*, 1977, 84, 1-20.

Jirage K.B., Hulthen J.C., Martin C.R., Nanotubule-based molecular-filtration membranes, *Science*, 1997, 278, 655-658.

Jurasekova Z., Del Puerto E., Bruno G., Garcia-Ramos J.V., Sanchez-Cortes S., Domingo C., Extractionless non-hydrolysis surface-enhanced Raman spectroscopic detection of historical mordant dyes on textile fibers *J. Raman Spectrosc.*, 2010, 41, 1455-1461.

Jurasekova Z., Garcia-Ramos J.V., Domingo C., Sanchez-Cortes S., Surface-Enhanced Raman scattering of flavonoids, *J. Raman Spectrosc.*, 2006, 37, 1239-1241.

Jurasekova Z., Marconi G, Sanchez-Cortes S, Torreggiani A., Spectroscopic and molecular modeling studies on the binding of the flavonoid luteolin and human serum albumin, *Biopolymers*, 2009, 91, 917-927.

Jurasekova Z., Sánchez-Cortés S., Tamba M., Torreggiani A., Silver nanoparticles active as surface-enhanced Raman scattering substrates prepared by high energy irradiation, *Vib. Spectrosc.*, 2011, 57, 42-48.

Kirby J., White R., National Gallery Tech. Bull., 1996, 17, 56-76.

Kwan K., Hyun S.L., Effect of Ag and Au Nanoparticles on the SERS of 4-Aminobenzenethiol Assembled on Powdered Copper, *J. Phys. Chem. B.*, 2005, 109, 18929-18934.

Kwan K., Jae K.Y., Raman Scattering of 4-Aminobenzenethiol Sandwiched between Ag/Au Nanoparticle and Macroscopically Smooth Au Substrate, *J. Phys. Chem. B.*, 2005, 109, 20731-20736.

Kwan K., Jeong-Yong C., Kuan S.S., Enhanced Raman Scattering in Gaps Formed by Planar Au and Au/Ag Alloy Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C.*, 2013, 117, 11421-11427.

Lee P.C., Meisel D., Adsorption and Surface-enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols, *J. Phys. Chem.*, 1982, 86, 3391-3395.

Leff D.V., Brandt L., Heath J.R., Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines, *Langmuir*, 1996, 12, 4723-4730.

Leona M., Decuzzi P., Kubic T.A., Gates G., Lombardi J.R., Non destructive identification of natural and synthetic organic colorants in works of art by surface enhanced Raman scattering, *Anal. Chem.*, 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, *J. Raman Spectrosc.*, 2006, 37, 981-992.

Lofrumento C., Ricci M., Platania E., Becucci M., Castellucci E., SERS detection of red organic dyes in Ag-agar gel, *J. Raman Spectrosc.*, 2013, 44, 47-54.

Ma Q., Zhang H, Liu W., Ge J., Wu J., Wang S., Wang P., Surface-Enhanced Raman scattering substrate based on cysteamine-modified gold nanoparticle aggregation for highly sensitive pentachlorophenol detection, *RSC Adv.*, 2016, 6, 85285-85292.

Marcaida I., Maguregui M., Morillas H., García-Florentino C., Pintus V., Aguayo T., Campos-Vallette M., Madariaga J.M., Optimization of sample treatment for the identification of anthraquinone dyes by surface-enhanced Raman spectroscopy, 2017, 409, 2221-2228.

McFarland A.D., Young M.A., Dieringer Jon A., Van Duyne R.P., Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109, 11279-11285

Menon L., Richter C., Friedman A., Wu Z., Panaitescu E., Synthesis of Nanomaterials Using Self-Assembled Nanotemplates, *J. Nanosci. Nanotechnol*, 2012, 12, 1-19.

Menon V.P, Martin C.R., Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 1920-1928.

Penner R.M., Martin C.R., Preparation and electrochemical characterization of ultramicroelectrode ensembles, *Anal. Chem.*, 1987, 59, 2625-2630.

Platania E., Lombardi J.R., Leona M., Shibayama N., Lofrumento C., Ricci M., Becucci M., Castellucci E., Rapid and direct detection of illicit dyes on tainted fruit peel using a PVA hydrogel surface enhanced Raman scattering substrate, *J. Raman Spectrosc*, 2014, 45, 1133-1139.

Possin G.E., A Method for Forming Very Small Diameter Wires, *Rev. Sci. Instrum.*, 1970, 41, 772-774.

Pozzi F., Leona M., Surface-enhanced Raman spectroscopy in art and archaeology, *J. Raman Spectrosc.*, 2016, 47, 67-77.

Pozzi F., Lombardi J.R., Bruni S., Leona M., Sample treatment considerations in the analysis of organic colorants by surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Chem.*, 2012, 84, 3751-3757.

Pozzi F., Lombardi J.R., Bruni S., Leona M., Sample treatment considerations in the analysis of organic colorants by surface-enhanced Raman scattering, *Anal Chem*, 2012, 84, 3751-3757.

Sanchez-Cortés S., Garcia-Ramos J.V., Anomalous Raman Bands Appearing in Surface-Enhanced Raman Spectra, *J. Raman Spectrosc.*, 1998, 29, 365-371.

Schlucker S., edited by “Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical Biophysical and Life Science Applications” WILEY-VCH, 2011.

Schönenberger C., Van der Zande B.M.I., Fokkink L.G.J., Henny M., Schmid C., Krüger M., Bachtold A., Huber R., Birk H., Staufer U., Template, Synthesis of Nanowires in Porous Polycarbonate Membranes: Electrochemistry and Morphology, *J. Phys. Chem. B*, 1997, 101, 5497-5505.

Schweppe H. and Runge H.R., Carmine-Cochineal Carmine and Kermes Carmine in “Artists' Pigments. A Handbook of their History and Characteristics” Vol 1, ed. Feller R.L. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.

Schweppe H. and Winter J. Madder and Alizarin in “Artists' Pigments. A Handbook of their History and Characteristics” Vol 3, ed. Fitzhugh E.W. Oxford University Press, Cambridge, 1997.

Shadi I.T., Chowdhry B.Z., Snowden M. J., Withnall R., Semi-quantitative analysis of indigo carmine, using silver colloids, by surface enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS), *Spectrochim. Acta A*, 2003, 59, 2213-2220.

Shadi Q.T., Chowdhry B.Z., Snowden M. J., Withnall R., Semi-quantitative analysis of indigo by surface enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) using silver colloids, *J. Raman Spectrosc.*, 2004, 35, 800-807.

Silvestrini M., Ugo P., Ensembles of nanoelectrodes modified with gold nanoparticles: characterization and application to DNA-hybridization detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, 405, 905-1005.

Socrates G., Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, John Wiley & Sons, LTD, 2001.

Stokes D.L., Chi Z.H., Vo-Dinh T., Surface-Enhanced-Raman-Scattering-Inducing Nanoprobe for Spectrochemical Analysis, *Appl. Spectrosc*, 2004, 58, 292-298.

Stortini A.M., Moretto L.M., Mardegan A., Ongaro M., Ugo P., Arrays of copper nanowire electrodes : Preparation, characterization and application as nitrate sensor, *Sensors and Actuators B*, 2015, 207, 186–192.

Teslova T., Corredor C., Livingstone R., Spataru T., Birke R.L., Lombardi J.R., Cañamares M.V., Leona M., Raman and surface-Enhanced Raman spectra of flavone and several hydroxy derivatives, *J. Raman Spectrosc.*, 2007, 38, 802-818.

Ugo P., Moretto L.M., Template Deposition of Metals. In C. Zosky (ed.), *Handbook of Electrochemistry*, 2007, chapter 16.2, Elsevier, Amsterdam.

Valley N., Greeneltch N., Van Duyne R.P., Schatz G.C., A Look at the Origin and Magnitude of the Chemical Contribution to the Enhancement Mechanism of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Theory and Experiment, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, 4, 2599-2604.

Whitney A.V., Casadio F., Van Duyne R.P., Identification and characterization of artists' red dyes and their mixtures by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Appl Spectros.*, 2007, 61, 994-1000.

Whitney A.V., Van Duyne R.P., Casadio F., An innovative surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) method for the identification of six historical red lakes and dyestuffs, *J. Raman Spectrosc.*, 2006, 37, 993–1002.

Whitney T.M., Searson P.C., Jiang J.S., Chien C.L., Fabrication and magnetic properties of arrays of metallic nanowires., *Science*, 1993, 261, 1316-1319.

Williams W.D., Giordano N., Fabrication of 80 Å metal wires, *Rev. Sci. Instrum.*, 1984, 55, 410-412.

Wirtz M., Martin C.R., Template-Fabricated Gold Nanowires and Nanotubes, *Adv. Mater.*, 2003, 15, 455-458.

Wustholz K.L., Brosseau C.L., Casadio F., Van Duyne R.P., Surface-enhanced Raman spectroscopy of dyes: from single molecules to the artists' canvas, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, 11, 7350-7359.

Zamuner M., Talaga D., Deiss F., Guieu V., Kuhn A., Ugo P., Sojic N., Fabrication of a microporous microwell array for Surface-Enhanced Raman Scattering, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, 19, 3129-3135.

Zhang Z., Dai S., Blom D.A., Shen J., Synthesis of Ordered Metallic Nanowires inside Ordered Mesoporous Materials through Electroless Deposition, *Chem. Mater.*, 2002, 14, 965-968.