



**Universidad
del Valle**

**Desarrollo y Evaluación de Plataformas SERS de
Heteroestructuras Ag-Au Optimizadas Mediante
Fragmentación Térmica para la Detección de
Mercurio Inorgánico**

Angélica Alejandra Perez Losada, estudiante.

Directores de Tesis:

Dr. Carlos A. Galíndez.

Dr. Luis A. Rodríguez.

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Física

Universidad del Valle

Santiago de Cali

Enero, 2026

Tabla de Contenido

1	INTRODUCCIÓN	10
1.1	JUSTIFICACIÓN	15
1.2	ALCANCE	15
1.3	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	16
1.3.1	<i>Objetivo General (OG)</i>	16
1.3.2	<i>Objetivos Específicos (OE)</i>	16
1.4	HIPÓTESIS	16
1.4.1	<i>Comportamiento de la señal Raman tras el tratamiento térmico y adición de Hg²⁺</i>	16
2	MARCO TEÓRICO	18
2.1	FRAGMENTACIÓN TÉRMICA DE PELÍCULAS DELGADAS	18
2.2	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE NANOESTRUCTURAS	18
2.3	PLASMONES ÓPTICOS	20
2.4	FACTOR DE MEJORA (EF)	22
2.5	FUNDAMENTOS DE CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN ANALÍTICA	24
2.5.1	<i>Calibración con banda plasmónica (LSPR)</i>	24
2.5.2	<i>Calibración con intensidad SERS</i>	25
3	ESTADO DEL ARTE	27
3.1	MERCURIO EN AGUA: ESPECIES Y NORMATIVAS	27
3.2	MÉTODOS ANALÍTICOS CONVENCIONALES PARA LA DETECCIÓN DE ANALITOS	28
3.3	SERS PARA SENSADO DE Hg ²⁺ -TIPO <i>TURN-OFF</i>	28
3.4	AG-AU POR SSD SOBRE BSG: RESULTADOS Y VACÍOS DE CONOCIMIENTO	29
4	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	31
4.1	FABRICACIÓN DE PELÍCULAS BIMETÁLICAS	31
4.2	PROTOCOLO DE EVAPORACIÓN	33
4.3	MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)	34
4.4	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	35
4.5	DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX/XRD)	38
4.6	ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV-Vis)	39
4.7	ESPECTROSCOPIA RAMAN	40
4.8	METODOLOGÍA <i>TURN-OFF</i> SEÑAL SERS	41
4.8.1	<i>Reactivos y preparación de soluciones</i>	41
5	RESULTADOS	44
5.1	CARACTERIZACIÓN TOPOGRÁFICA (AFM)	44
5.2	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA (SEM) Y COMPOSICIONAL (EDS)	46
5.2.1	<i>SEM de las plataformas S1-3 as-deposited y con tratamiento térmico de 3.0 horas</i>	46
5.2.2	<i>SEM de las plataformas S1-3 con tratamiento térmico de 0.5 y 1.0 horas</i>	47
5.2.3	<i>EDS de sistemas S1-S3 as-deposited y 3.0 horas de tratamiento térmico</i>	49
5.3	CARACTERIZACIÓN ÓPTICA (UV-Vis)	50
5.4	CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL (RAYOS X)	53
5.1	CARACTERIZACIÓN DE ESPECTROSCOPIA RAMAN	54
5.2	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	62
6	CONCLUSIONES	64
7	PERSPECTIVAS Y TRABAJOS FUTUROS	65
8	BIBLIOGRAFÍA	66

Lista de Acrónimos

Acrónimo	Término en español	Término en inglés (si aplica)
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica	Atomic Force Microscopy
AAS	Espectroscopía de Absorción Atómica	Atomic Absorption Spectroscopy
BSG	Vidrio borosilicato	Borosilicate Glass
CM	Mecanismo químico (en SERS)	Chemical Mechanism
CV	Coefficiente de variación	Coefficient of Variation
CVAAS	Espectroscopía de Absorción Atómica por Vapor Frío	Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy
CVAFS	Espectroscopía de Fluorescencia Atómica por Vapor Frío	Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectroscopy
DRX / XRD	Difracción de Rayos X	X-Ray Diffraction
EDS	Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
EF	Factor de mejora	Enhancement Factor
EM	Mecanismo electromagnético (en SERS)	Electromagnetic Mechanism
GI-XRD	Difracción de Rayos X en Incidencia Rasante	Grazing Incidence X-ray Diffraction
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IDEAM	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales	—
LSPR	Resonancia de Plasmón Superficial Localizado	Localized Surface Plasmon Resonance
LOD	Límite de detección	Limit of Detection
NPs	Nanopartículas	Nanoparticles
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible	Sustainable Development Goals
PVD	Deposición Física en Fase Vapor	Physical Vapor Deposition
QCM	Microbalanza de Cristal de Cuarzo	Quartz Crystal Microbalance
Ra	Rugosidad media aritmética	—
RhB	Rodamina B	Rhodamine B
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido	Scanning Electron Microscopy
SERS	Espectroscopía Raman Intensificada por Superficie	Surface-Enhanced Raman Scattering
SSD	Fragmentación térmica en estado sólido	Solid-State Dewetting
UV-Vis	Espectroscopía Ultravioleta-Visible	Ultraviolet-Visible Spectroscopy
WHO / OMS	Organización Mundial de la Salud	World Health Organization
PDF	—	Powder Diffraction File
ICDD	—	International Centre for Diffraction Data

Lista de Símbolos

Símbolo	Descripción	Unidad
λ	Longitud de onda	nm
λ_{max}	Longitud de onda de máxima resonancia plasmónica (LSPR)	nm
θ	Ángulo de Bragg	grados (°)
d	Distancia interplanar	nm o Å
I_0	Intensidad SERS inicial (antes de Hg^{2+})	u.a.
I	Intensidad SERS después de la interacción con Hg^{2+}	u.a.
Ra	Rugosidad media aritmética	nm
D	Tamaño medio de grano o dominio	nm
EF	Factor de mejora SERS	adimensional
Hg^{2+}	Ion mercurio divalente	—
Ag	Plata	—
Au	Oro	—
n	Índice de refracción del medio	adimensional
$FWHM$	Ancho a media altura (<i>Full Width at Half Maximum</i>)	nm

Dedicatoria

*A mis padres,
Marlene Losada Medina y Gerardo Pérez Ríos,
quienes viven en mí.*

“Morir es dormir, tal vez soñar.”— William Shakespeare —

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta tesis doctoral.

En primer lugar, agradezco profundamente a mis directores de tesis, el Dr. Carlos A. Galíndez y el Dr. Luis A. Rodríguez, por su orientación, acompañamiento permanente y valiosas discusiones científicas, que fueron fundamentales para la consolidación de este trabajo. Su rigurosidad académica, su compromiso con la investigación y su apoyo constante han sido esenciales para mi formación como investigadora.

De manera muy especial, expreso mi gratitud a la profesora Lorena Marín, del Servicio Geológico Colombiano, por su dirección, apoyo y aportes científicos a lo largo de este trabajo. Su experiencia y acompañamiento fortalecieron significativamente el enfoque y el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a la Universidad del Valle, a la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, al Centro de Excelencia en Nuevos Materiales (CENM) y al grupo de investigación Quantum Optics Group, por brindar el entorno académico, los recursos y la infraestructura necesarios para la realización de esta investigación.

Extiendo mi reconocimiento a los laboratorios y grupos de investigación que brindaron apoyo técnico y científico, en particular al Laboratorio de Instrumentación y Óptica Aplicada, así como a los grupos de investigación en física y materiales que hicieron posible el desarrollo experimental de este trabajo.

Agradezco especialmente el respaldo de los proyectos de investigación que financiaron y apoyaron esta tesis, entre ellos:

“Evaluation of heavy metals in freshwater to prevent and alert human consumption”, financiado por la Royal Academy of Engineering – Newton Fund (Industry Academia Partnership Programme).

“Implementación de un sistema de monitoreo periódico y en tiempo real para cuerpos de agua superficial continental con sensores remotos, base de datos y procedimientos de diseño propio para el departamento de Bolívar” (código BPIN 2020000100467).

Programa “Nanociencia y Nanotecnología (NANOMAT)”, liderado por la Universidad del Valle en colaboración con otras instituciones nacionales.

“Fabricación de nanosensores plasmónicos para la detección de contaminantes emergentes y metales pesados presentes en el agua”, financiado por la Convocatoria Interna Universidad del Valle No. 162-2024.

Estos proyectos fueron fundamentales para el desarrollo experimental, la adquisición de materiales y el fortalecimiento del enfoque aplicado de esta investigación.

A mis colegas y compañeros de investigación, gracias por su colaboración, disposición y motivación constante durante este proceso.

Finalmente, expreso mi más profundo agradecimiento a mi familia y a mis amigos, quienes han sido el apoyo emocional fundamental a lo largo de este camino. De manera muy especial, a mis padres, Marlene Losada Medina y Gerardo Pérez Ríos, quienes, aunque ya no están físicamente, viven en mí y en cada uno de mis logros; su amor, ejemplo y enseñanzas han sido la fuerza que me ha permitido llegar hasta aquí. A mi hermano, José Miguel Pérez Losada, mi mejor amigo e incondicional compañero, por su apoyo constante y su presencia firme en cada etapa de mi vida. Y a mi esposo, Mario Fernando Quiñonez Penagos, por ser mi compañero de vida y también mi compañero académico, por su comprensión, apoyo y por ser una fuente permanente de inspiración en este proceso.

Resumen

Esta tesis doctoral desarrolla nanoestructuras sensoras bimetálicas Ag–Au de bajo costo para la detección cualitativa de mercurio inorgánico (Hg^{2+}) en agua, mediante efectos plasmónicos y espectroscopía Raman mejorada en superficie (SERS). El enfoque experimental comprende: (i) la deposición por evaporación térmica de bicapas metálicas Ag–Au sobre sustratos de vidrio borosilicato (BSG/Ag/Au) y (ii) la nanoestructuración por fragmentación térmica en estado sólido (*Solid-State Dewetting, SSD*), controlando la temperatura, el tiempo y la rampa de temperatura, con el fin de maximizar la densidad de regiones activas (*hot spots*) y la respuesta SERS.

Las nanoestructuras se caracterizan mediante SEM/EDS y AFM para determinar el tamaño, la altura y la densidad superficial, y mediante UV–Vis para identificar la longitud de onda de resonancia plasmónica (λ_{LSPR}) y el ancho a media altura (*FWHM*) como indicadores ópticos del estado de la nanoestructura. La actividad SERS del sustrato se verifica mediante la rodamina B como molécula marcadora. Posteriormente, la interacción con Hg^{2+} se evalúa mediante cambios reproducibles en la señal SERS (atenuación o modificaciones relativas de bandas seleccionadas en ~ 1350 y $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$), lo que permite definir un criterio de decisión cualitativo basado en razones de intensidad y en variaciones del umbral de respuesta para discriminar entre muestras sin Hg^{2+} y con Hg^{2+} en un rango de interés cercano a niveles regulatorios.

Finalmente, se correlacionan las métricas morfológicas y ópticas con el desempeño del sensor para establecer relaciones estructura–respuesta que guíen la optimización del sustrato y reduzcan la variabilidad, mediante ensayos de repetibilidad, estabilidad y selectividad frente a posibles interferentes. Se espera obtener una plataforma SERS funcional y reproducible para el tamizaje cualitativo de Hg^{2+} en agua, con potencial de implementación en entornos de laboratorio y bajo costo operativo.

Abstract

This doctoral thesis develops low-cost bimetallic Ag–Au sensing nanostructures for the qualitative detection of inorganic mercury (Hg^{2+}) in water, based on plasmonic effects and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). The experimental approach involves: (i) the deposition of Ag–Au metallic bilayers on borosilicate glass substrates (BSG/Ag/Au) via thermal evaporation, and (ii) nanostructuring through Solid-State Dewetting (SSD), by controlling temperature, time, and heating rate, in order to maximize the density of active regions (hot spots) and enhance the SERS response.

The nanostructures are characterized using SEM/EDS and AFM to determine size, height, and surface density, and by UV–Vis spectroscopy to identify the localized surface plasmon resonance wavelength (λ_{LSPR}) and the full width at half maximum (FWHM) as optical indicators of the nanostructure state. The SERS activity of the substrates is evaluated using Rhodamine B as a probe molecule. Subsequently, the interaction with Hg^{2+} is assessed through reproducible changes in the SERS signal (attenuation or relative modifications of selected bands at ~ 1350 and $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$), enabling the definition of a qualitative decision criterion based on intensity ratios and response threshold variations to discriminate between Hg^{2+} -free and Hg^{2+} -containing samples within a concentration range close to regulatory limits.

Finally, morphological and optical metrics are correlated with sensor performance to establish structure–response relationships that guide substrate optimization and reduce variability, through repeatability, stability, and selectivity tests against potential interferents. The goal is to develop a functional, reproducible SERS platform for the qualitative screening of Hg^{2+} in water, with potential implementation in laboratory environments and low operational cost.

1 Introducción

La contaminación por mercurio (Hg) en sistemas acuáticos constituye un problema prioritario de salud pública y ambiental debido a su alta toxicidad, persistencia ambiental y capacidad de transformarse en especies altamente bioacumulables [1], [2]. La problemática de la contaminación por mercurio en los sistemas acuáticos también se enmarca entre los desafíos globales definidos por los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas [3]. En particular, este trabajo se relaciona con el ODS 6: Agua limpia y saneamiento, cuyo objetivo es garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua para todos. La meta 6.3 establece la necesidad de mejorar la calidad del agua mediante la reducción de la contaminación y la minimización de los vertimientos de sustancias peligrosas. En este contexto, el desarrollo de plataformas analíticas sensibles para la detección de metales pesados, como Hg^{2+} , contribuye al fortalecimiento de las capacidades de monitoreo ambiental y a la protección de los recursos hídricos [3]. La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization, WHO*) advierte que el mercurio puede causar efectos adversos graves, especialmente durante el desarrollo intrauterino y la primera infancia, afectando principalmente al sistema nervioso central, así como a los riñones y otros órganos [4]. La exposición humana ocurre predominantemente a través del consumo de agua y de biota acuática contaminados, así como por la inhalación de vapores de mercurio elemental, según la especie química y la dosis de exposición [2], [5].

En el contexto del agua destinada al consumo humano, los marcos regulatorios internacionales establecen límites estrictos para el mercurio. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (*U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA*) fija un nivel máximo de contaminante de 2 $\mu\text{g/L}$ (2 ppb o $\sim 10 \text{ nM}$) para mercurio inorgánico en agua potable [6], mientras que la Unión Europea establece un valor paramétrico de 1 $\mu\text{g/L}$ y las guías de la OMS reportan valores de referencia del orden de pocos microgramos por litro [5], [7]. Estas regulaciones evidencian la necesidad de contar con métodos analíticos capaces no solo de cuantificar el mercurio a niveles traza, sino también de generar alertas tempranas que permitan una gestión oportuna del riesgo, especialmente en escenarios donde el monitoreo sistemático es limitado.

En Colombia, la problemática del mercurio está fuertemente asociada a actividades extractivas, en particular a la minería de oro artesanal y de pequeña escala, que contribuye a la liberación y al transporte de mercurio hacia los sistemas hídricos superficiales. Informes oficiales del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) han documentado la presencia de mercurio como resultado de presiones antrópicas, con impactos ambientales y sanitarios relevantes en diversas regiones del país [8]. A nivel internacional, la Convención de Minamata sobre el Mercurio constituye el principal marco para la reducción de emisiones y liberaciones antropogénicas y destaca la necesidad de fortalecer las capacidades de monitoreo ambiental, especialmente en países en desarrollo [9]. En comunidades vulnerables, la contaminación por mercurio no solo compromete la salud pública, sino también la seguridad alimentaria y la economía local, lo que refuerza la urgencia de estrategias de vigilancia ambiental eficientes y accesibles.

Desde el punto de vista analítico, la determinación de mercurio en agua se realiza tradicionalmente mediante técnicas altamente sensibles y confiables, como la espectroscopía de absorción atómica por vapor frío (CVAAS), la espectroscopía de fluorescencia atómica por vapor frío (CVAFS) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Si bien estos métodos constituyen el estándar de referencia, presentan limitaciones operativas significativas, incluyendo elevados costos de instrumentación y operación, consumo de reactivos y gases, preparación extensiva de muestras y la necesidad de laboratorios centralizados y de personal altamente especializado (Tabla 1) [10], [11], [12]. Estas características incrementan el costo por muestra y restringen su aplicación en esquemas de monitoreo extensivo, frecuente y distribuido geográficamente, particularmente en regiones con limitaciones presupuestales y con infraestructura analítica concentrada únicamente en las regiones urbanas centrales.

Técnica	Principio de detección	Ventajas principales	Limitaciones operativas y logísticas
CVAAS	Reducción química del mercurio a estado elemental y medición de la absorción óptica	Método estandarizado y ampliamente validado; buena sensibilidad para mercurio en agua	Requiere laboratorio equipado, reactivos químicos, control estricto de calidad y personal especializado; no apto para mediciones en campo. no portátil. ~1.5 veces más costoso que el SERS.
CVAFS	Oxidación del mercurio, purga y atrapamiento, seguido de detección por fluorescencia	Muy alta sensibilidad y selectividad para mercurio disuelto en agua	Equipos delicados y costosos; alto control de contaminación; preparación compleja de muestras; baja portabilidad. No portátil. ~1.5 veces más costoso que el SERS.
ICP-MS	Ionización del analito en plasma y detección por relación masa/carga	Altísima sensibilidad; análisis multielemento; método confirmatorio de referencia	Muy alto costo de adquisición y operación; consumo de gases y reactivos; infraestructura especializada; no portátil. ~3.5 veces más costoso que el SERS.
SERS	Intensificación de la señal Raman mediante efectos plasmónicos locales en superficies nanoestructuradas de oro/plata	Medición rápida; mínima preparación de muestra; bajo consumo de reactivos; potencial para análisis <i>in situ</i> y uso como método de tamizaje o alerta temprana	Dependencia de la reproducibilidad del sustrato; cuantificación aún en desarrollo; requiere validación frente a métodos estandarizados

Tabla 1. Comparación de algunos métodos estándar para la detección de Hg en agua vs. SERS.

Técnica	Costo del equipo (USD)	Costo operativo anual	Costo por análisis	Funcionalidad
CVAAS (Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy)	25,000 – 60,000 [7], [8]	3,000 – 8,000 [8]	5 – 15 USD [9]	Técnica clásica altamente selectiva para Hg
CVAFS (Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectroscopy)	40,000 – 90,000 [7], [10]	4,000 – 10,000 [10]	10 – 20 USD [9]	Alta sensibilidad para Hg

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)	150,000 – 500,000 [1], [4]	25,000 – 70,000 [3]	20 – 80 USD [5], [6]	Técnica multielemental ultra-traza
Raman portátil + plataformas SERS (Au/Ag)	30,000 – 45,000 [11]	500 – 2,000 [12]	0.5 – 3 USD [12]	Alternativa portátil y de bajo costo

En este contexto, los sensores basados en espectroscopía Raman intensificada por superficie (*Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS*) emergen como una alternativa tecnológica de bajo costo operativo, no porque el espectrómetro Raman sea intrínsecamente económico (aunque existen equipos portátiles de bajo costo), sino porque el enfoque analítico reduce sustancialmente los costos asociados al análisis por muestra. SERS permite mediciones rápidas, con mínima preparación de la muestra, sin digestión química ni consumo de gases, y con potencial de implementación *in situ* mediante sistemas Raman portátiles u ópticamente simplificados. Estas características hacen de SERS una herramienta particularmente adecuada para aplicaciones de tamizaje o de alerta temprana, reduciendo la necesidad de análisis confirmatorios sistemáticos mediante técnicas de alto costo [13], [14]. Desde una perspectiva de política pública, este enfoque resulta especialmente relevante para Colombia, donde la capacidad analítica avanzada para metales pesados se concentra en pocos laboratorios y el monitoreo ambiental continuo se ve limitado por costos logísticos; en este sentido, la adopción de tecnologías de sensado de bajo costo ha sido identificada como una estrategia clave para ampliar la cobertura y optimizar recursos en los sistemas de vigilancia ambiental [15]. En este marco, la presente investigación se alinea con los ODS de las Naciones Unidas, en particular con el ODS 6, orientado a garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento. De manera específica, el trabajo contribuye al componente de mejora de la calidad del agua y al fortalecimiento de las capacidades de monitoreo mediante el uso de tecnologías e innovación. Desde una perspectiva operativa, la propuesta se enfoca en habilitar un método de alerta temprana y tamizaje basado en SERS, capaz de orientar las decisiones de muestreo confirmatorio, fortalecer la vigilancia local y apoyar la priorización de intervenciones. En esta tesis se aborda la detección de Hg^{2+} desde un enfoque cualitativo de tipo tamizaje, priorizando la reproducibilidad y la respuesta diferencial frente a los límites de cuantificación. Este enfoque contribuye a una gestión más eficiente de la calidad del agua y a la reducción del riesgo asociado a contaminantes como el mercurio, especialmente en contextos con infraestructura analítica limitada [13].

El desempeño de SERS se fundamenta en el realce de la señal Raman inducido por plasmones superficiales localizados en nanoestructuras metálicas, donde regiones altamente localizadas del campo eléctrico, conocidas como *hot spots*, permiten alcanzar factores de mejora elevados (*Enhancement Factors, EF*). La respuesta SERS depende fuertemente de la morfología de las nanoestructuras, incluyendo el tamaño, la forma, la separación y la densidad espacial, así como de su respuesta óptica localizada (*Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR*), caracterizada por la posición y el ancho de banda del pico plasmónico [16], [17]. Estas propiedades hacen de SERS una técnica altamente sensible y selectiva, atractiva para la detección de contaminantes de traza, como Hg^{2+} , en matrices acuosas.

No obstante, a pesar del crecimiento sostenido de la literatura sobre sensores SERS para la detección de Hg^{2+} , la mayoría de los estudios se centran en demostraciones de sensibilidad en condiciones idealizadas, sin establecer correlaciones cuantitativas robustas entre la morfología de

las nanoestructuras plasmónicas, su respuesta óptica LSPR y el desempeño analítico en SERS. En los últimos años, numerosos estudios han explorado el uso de nanoestructuras plasmónicas para la detección ultrasensible de metales pesados mediante SERS. En particular, sistemas basados en nanopartículas de oro y plata han demostrado generar intensificaciones significativas del campo electromagnético local, lo que favorece la formación de *hot spots* responsables del aumento de la señal Raman [2], [3]. Sin embargo, muchos de estos enfoques dependen de métodos de fabricación complejos, como la litografía electrónica o el ensamblaje coloidal controlado, lo que puede limitar su reproducibilidad y escalabilidad. En contraste, el uso de procesos de solid-state dewetting (SSD) para inducir la fragmentación térmica de películas metálicas delgadas ofrece una estrategia relativamente simple y reproducible para generar nanoestructuras plasmónicas activas, permitiendo controlar la morfología superficial y optimizar la respuesta SERS del sustrato [4].

En particular, son escasos los trabajos que integren de manera sistemática la caracterización morfológica (SEM/AFM), la respuesta plasmónica y métricas analíticas reproducibles para Hg^{2+} en matrices acuosas simples. Asimismo, aunque la técnica de SSD ha sido ampliamente utilizada para la fabricación de nanoestructuras metálicas, su aplicación en sistemas Ag–Au orientados a sensores SERS para mercurio es limitada y la literatura carece de criterios de diseño claros que permitan optimizar simultáneamente la reproducibilidad, la sensibilidad y la estabilidad del sensor. Esta ausencia de correlaciones cuantitativas y de estrategias de optimización morfológica constituye una brecha crítica que restringe la transición de SERS desde pruebas de concepto hasta herramientas confiables de detección preliminar o de alerta temprana en escenarios ambientales reales [18], [19], [20].

Para contextualizar esta brecha, se realizó un análisis bibliométrico de la producción científica sobre sensores SERS para la detección de mercurio en la última década, a partir de registros de la base de datos *Scopus* usando los siguientes criterios de búsqueda: (consulta: [13/Ago/2024]; filtros: artículos y revisiones; 2015–2025; *Con la cadena TITLE-ABS-KEY((SERS OR "surface-enhanced raman") AND (mercury OR Hg^{2+}) AND (sensor* OR detection))*). Los resultados muestran un incremento significativo en el número de publicaciones anuales, especialmente a partir de 2019 (figura 1), lo que evidencia un interés creciente en la temática.

Sin embargo, el análisis de coocurrencia de palabras clave usando VOSviewer (análisis de coocurrencia, palabras clave, conteo total, normalización por fuerza de asociación y diseño de un archivo de tesauro para unificar sinónimos). Red construida a partir de registros *Scopus* (consulta: 13 de agosto de 2025; $n \approx 130$ artículos). Análisis de coocurrencia, todas las palabras clave, conteo completo; se visualizaron 344 términos tras indicar un mínimo de 10 ocurrencias; se encontraron 31 palabras clave. El tamaño del nodo es proporcional a las ocurrencias; el grosor del enlace, a la fuerza de co-ocurrencia; los colores indican clústeres temáticos. Una búsqueda específica para *TITLE-ABS-KEY((SERS OR "surface-enhanced raman") AND (mercury OR Hg^{2+}) AND (sensor* OR detection) AND (dewetting OR "solid-state dewetting"))* ver figura 2. Este análisis bibliométrico revela una baja representación de estudios que aborden nanoestructuras Ag–Au obtenidas por SSD y que correlacionen de forma integral morfología, respuesta LSPR y desempeño SERS. Este hallazgo confirma que la brecha identificada persiste en la literatura actual y fundamenta los objetivos específicos de esta investigación

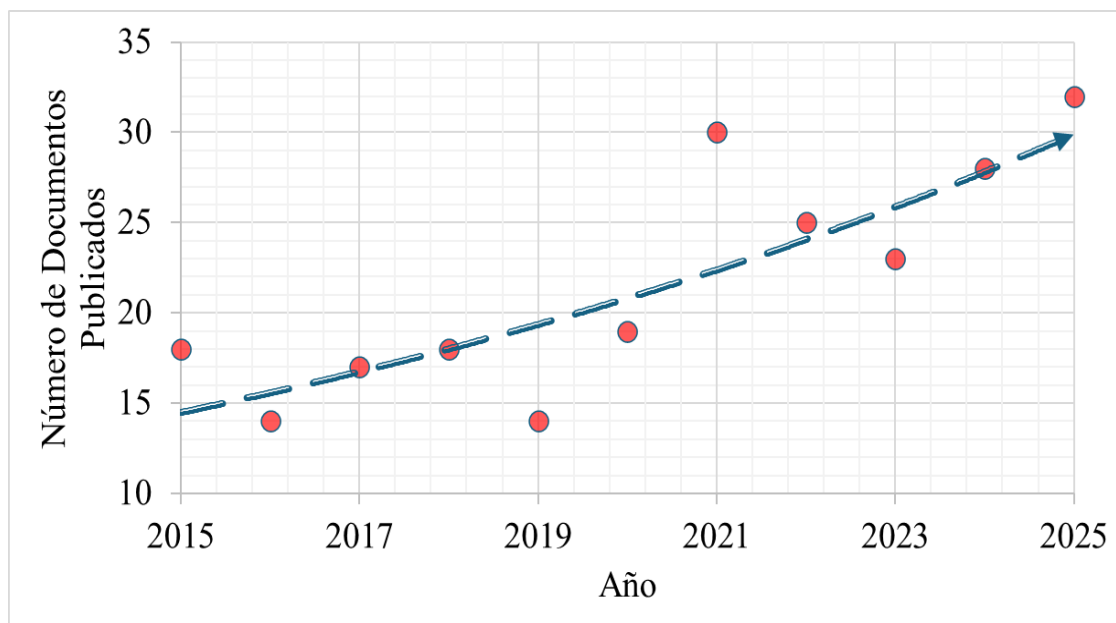


Figura 1. Análisis bibliométrico (Scopus, consulta: 13 de agosto de 2025).

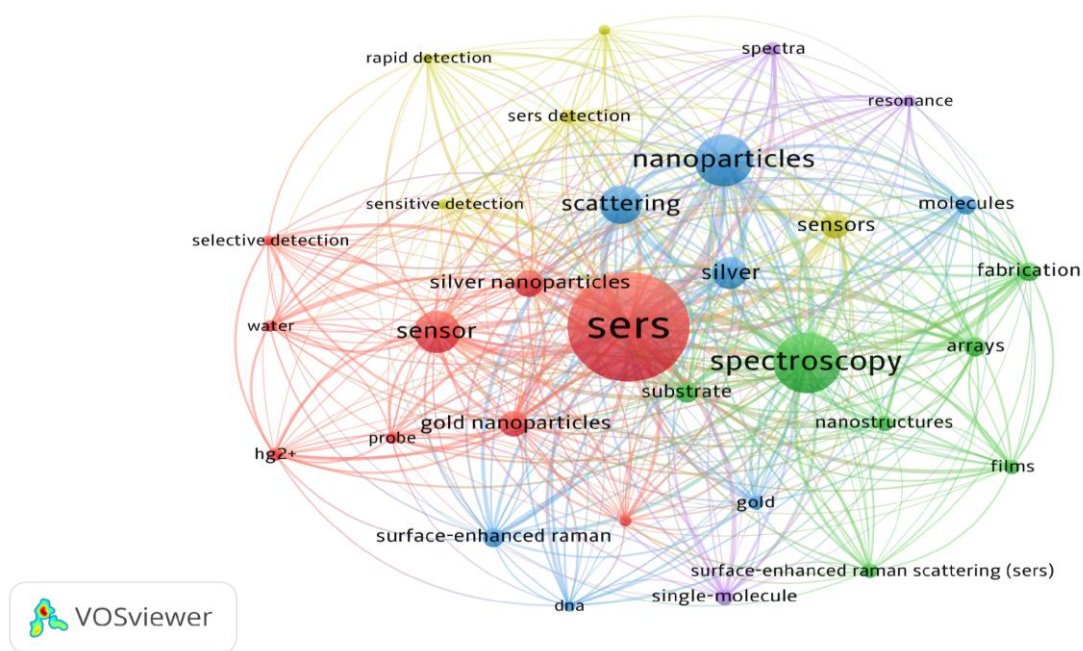


Figura 2. Mapa de co-ocurrencia de palabras clave (VOSviewer) de la literatura sobre nanoestructuras plasmónicas/SERS para detección de Hg^{2+} .

1.1 Justificación

Como se mencionó anteriormente, la detección de Hg^{2+} a niveles de $\mu\text{g/L}$ es prioritaria debido a los problemas asociados a este, ya mencionados, y a los estándares permitidos en el agua potable. Esta problemática se alinea con el ODS 6, que busca "Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y saneamiento para todos" [21], [22] Particularmente, resulta preocupante la presencia de metales pesados debido a su persistencia en el ambiente, resistencia a métodos convencionales de remediación y efectos tóxicos acumulativos. En Colombia, la contaminación por metales pesados, como el mercurio, es crítica, especialmente debido a la minería ilegal y al vertimiento industrial-agrícola, según el informe del IDEAM de 2021 [8]. En este contexto, las nanoestructuras plasmónicas basadas en SERS y LSPR ofrecen una alternativa altamente sensible y de bajo costo para la detección de mercurio en bajas concentraciones presentes en fuentes hídricas locales, respaldada por un microscopio Raman, con el cual cuenta el Centro de Excelencia de Nuevos Materiales (CENM) de la Universidad del Valle. La viabilidad tecnológica de la técnica SSD permitirá producir nanoestructuras controlando el espesor, la temperatura, el tiempo y la rampa térmica, con una infraestructura accesible (evaporación y tratamiento térmico). La contribución esperada de este trabajo es establecer una correlación cuantitativa entre la morfología de las nanoestructuras y los fenómenos LSPR y SERS para la detección de Hg^{2+} , en la que las nanoestructuras se obtendrán a partir de heteroestructuras delgadas de Ag-Au, las cuales serán sometidas a un proceso de SSD.

1.2 Alcance

Esta propuesta se enfoca en la detección de Hg^{2+} en agua bajo condiciones controladas de laboratorio, preservando y ajustando el pH ($\approx 2-3$), lo que proporciona estabilidad al analito y evita su hidrólisis. Se establecerá un rango de trabajo de $5-10000 \text{ nM}$ ($\approx 0,2-1,8 \text{ ppb}$) para demostrar sensibilidad a niveles inferiores a $\mu\text{g/L}$ y se construirán curvas de calibración. Las plataformas SERS se fabricarán a partir de bicapas de Ag-Au depositadas sobre sustratos de borosilicato (BSG) mediante métodos de deposición física a vapor (evaporación térmica o pulverización catódica), las cuales se nanoestructurarán mediante SSD. La caracterización física de las nanoestructuras SERS se realizará empleando diversas técnicas de medida: (i) microscopía electrónica de barrido (SEM) y de fuerza atómica (AFM) para analizar el tamaño, densidad, morfología y rugosidad de las nanoestructuras; (ii) espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) para determinar λ_{LSPR} y FWHM del plasmón superficial localizado; (iii) microscopía Raman para analizar la respuesta analítica mediante SERS (validación con Rodamina B y esquema *turn-off* frente a Hg^{2+}). Pregunta de Investigación

En este contexto, la presente propuesta de investigación se centra en responder la siguiente pregunta: ¿Cómo influyen las propiedades estructurales y morfológicas de nanosensores bimetalicos (Au-Ag) en la sensibilidad para la detección de mercurio inorgánico (Hg^{2+}) en agua, fabricados mediante el método de fragmentación térmica basado en efectos plasmónicos?

1.3 Objetivos e Hipótesis

De acuerdo con la discusión realizada a lo largo de esta propuesta de investigación, y en busca de responder la pregunta problema:

¿Cómo influyen las propiedades estructurales y morfológicas de nanosensores bimetalicos (Au-Ag) en la sensibilidad para la detección de mercurio inorgánico (Hg^{2+}) en agua, fabricados mediante el método de fragmentación térmica basado en efectos plasmónicos? Se establecen el objetivo general y los objetivos específicos indicados a continuación para dar respuesta a la pregunta de investigación.

1.3.1 Objetivo General (OG)

Desarrollar nanosensores bimetalicos Ag-Au de bajo costo cuyas propiedades estructurales y morfológicas optimicen la sensibilidad para la detección de mercurio inorgánico (Hg^{2+}) en agua mediante efectos plasmónicos.

1.3.2 Objetivos Específicos (OE)

- Fabricar nanoestructuras bimetalicas Ag-Au para su uso como sensores de mercurio inorgánico en agua.
- Caracterizar estructural, morfológica y ópticamente las nanoestructuras bimetalicas.
- Evaluar la sensibilidad de las nanoestructuras bimetalicas como sensores de mercurio inorgánico en el agua.

1.4 Hipótesis

La idea central de este trabajo es evidenciar cómo la fabricación de nanosensores Ag-Au tratados térmicamente por SSD, junto con su caracterización SEM/AFM–UV–Vis (LSPR) y evaluación SERS, está diseñada para determinar cómo la morfología controlada de las heteroestructuras Ag-Au rige los parámetros LSPR y, por tanto, la eficiencia y el comportamiento de la señal SERS frente a Hg^{2+} . De confirmarse, al optimizar el SSD (tamaño y densidad de nanoestructuras) y validar su LSPR, la adición de Hg^{2+} producirá una atenuación sistemática (*turn-off*) de la señal SERS, dependiente de la dosis y del tiempo, lo que permitirá evaluar si es posible construir curvas de calibración o estimar el LOD. Con este marco, se formulan las hipótesis que se desarrollan a continuación.

1.4.1 Comportamiento de la señal Raman tras el tratamiento térmico y adición de Hg^{2+}

En las plataformas SERS de nanoestructuras bimetalicas tipo BSG/Ag/Au producidas mediante fragmentación térmica, la presencia de iones de mercurio (Hg^{2+}) conduce a una disminución sistemática de la intensidad de Raman del analito. La razón principal es la alta afinidad del Hg^{2+} con la plata: al llegar a la superficie de la plataforma, el Hg^{2+} se reduce a mercurio metálico [23], [24], [25]. Esta interacción del mercurio con metales nobles se inicia con la adsorción superficial de Hg y continúa con la difusión mutua de átomos de un material a otro, lo que produce amalgamas Au–Hg/Ag–Hg (enlace metálico); este proceso reconfigura la nanomorfología y la LSPR,

conduciendo a la disminución de la actividad SERS debido a la pérdida de *hot spots*. Esta nueva capa modifica la nanoestructura del sustrato (las islas se redondean y aumenta la separación entre ellas) y desajusta la resonancia plasmónica que concentra el campo eléctrico en los *hot spots*. Al debilitarse ese campo localizado, se reduce el factor de mejora SERS (*EF*, por sus siglas en inglés) y, por tanto, disminuye la señal del marcador.

Experimentalmente, el sensor se comporta como un sistema *de tipo turn-off*: *en lugar de aumentar, la señal disminuye a medida que aumenta la concentración de mercurio* en la superficie. La magnitud de la caída depende principalmente de la concentración de Hg^{2+} añadida y del tiempo de exposición (cuanto mayor sea la cantidad de amalgama, mayor será la atenuación). Esta respuesta predecible —observada de manera consistente en sistemas de Ag y Ag/Au— sustenta la hipótesis de trabajo: en un sustrato previamente sometido a tratamiento térmico, la adición controlada de Hg^{2+} produce una disminución cuantificable y proporcional de la señal SERS del marcador, directamente ligada a la extensión de la amalgamación superficial y al consiguiente debilitamiento del realce óptico.

2 Marco Teórico

2.1 Fragmentación térmica de películas delgadas

El SSD es la evolución morfológica termoinducida de una película metálica continua en islas que minimizan la energía libre de superficie e interfaz. El tratamiento térmico activa la difusión superficial impulsada por capilaridad (fuerzas asociadas a la tensión superficial que empujan al sistema a reducir su energía de superficie/interfaz); emergen agujeros y cuellos que crecen y dan lugar a separaciones y a la coalescencia (fusión de islas vecinas en una partícula mayor), reduciendo el área interfacial y curvaturas de alta energía (ver figura 3). En nanopartículas bimetálicas Ag-Au, el calentamiento puede acompañarse de interdifusión (difusión mutua de los átomos de ambos metales a través de su interfaz) y segregación superficial (típicamente, la Ag migra a la superficie del elemento de menor energía superficial), lo que ajusta el tamaño y la composición de las nanoislas obtenidas mediante SSD. Parámetros de proceso tales como espesor inicial, temperatura, tiempo y rampa térmica; junto con factores del depósito (sustrato, atmósfera, presión y tasa de evaporación), controlan la densidad, el tamaño medio y la dispersión de islas y, por ende, la distribución de *hot spots* relevante para LSPR/SERS. En metales nobles depositados sobre vidrio o sílice, el SSD constituye una vía simple, reproducible y escalable de nanofabricación sin litografía. Además, los parámetros ópticos LSPR (posición λ_{LSPR} y $FWHM$) y SERS (factor de mejora, EF) dependen del tamaño, la forma y el espaciamiento de las nanoislas, lo que justifica la optimización morfológica mediante SSD para maximizar la respuesta óptica.

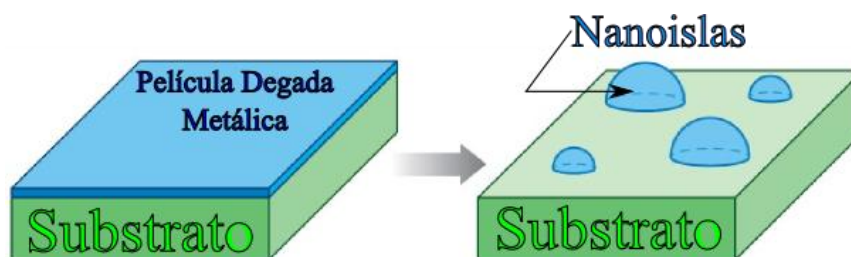


Figura 3. Esquema del proceso de nanoestructuración, por SSD, de una película metálica delgada. Figura modificada de la Ref. [26].

2.2 Caracterización Morfológica de Nanoestructuras

Para caracterizar la morfología y la distribución de las nanoestructuras obtenidas (por ejemplo, las nanopartículas formadas por fragmentación térmica), se emplean técnicas de microscopía, como la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM), que proporcionan información complementaria. El SEM utiliza un haz de electrones focalizado que escanea la superficie de la muestra y genera imágenes a partir de los electrones secundarios emitidos por ella. El SEM es ideal para observar la morfología superficial y la topografía de la muestra con resoluciones del orden de los nanómetros. Por otro lado, el AFM opera mediante una punta muy afilada, montada en un cantiléver flexible, que barre la superficie de la muestra y registra las fuerzas de interacción atómica entre la punta y la superficie. El AFM proporciona mediciones cuantitativas de la altura y la rugosidad superficial a escala nanométrica. Por ejemplo, el AFM permite determinar la altura y la rugosidad de las películas previas al SSD, a fin de

establecer la línea base del análisis topográfico. Adicionalmente, el SEM y el AFM son técnicas complementarias: mientras el SEM ofrece imágenes 2D de áreas relativamente grandes y con alta resolución lateral, ideales para ver la forma y el tamaño lateral de las nanopartículas, el AFM proporciona información topográfica en 3D, incluyendo la altura y el volumen de las nanoestructuras, con una resolución vertical de unos pocos nanómetros, como se aprecia en las figuras 4 y 5. En este trabajo de tesis, se recurre al SEM para observar la distribución y el diámetro de las nanopartículas formadas por fragmentación térmica y a AFM para corroborar su altura y estudiar la homogeneidad de la superficie a nanoescala.

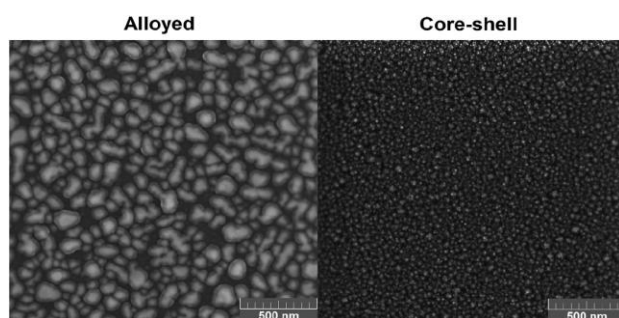


Figura 4. Imagen SEM obtenida para (izq.) las aleaciones Au-Ag y (der.) los sistemas core-shell Au/Ag. Figura tomada de la referencia Kvitek 2020 [27].

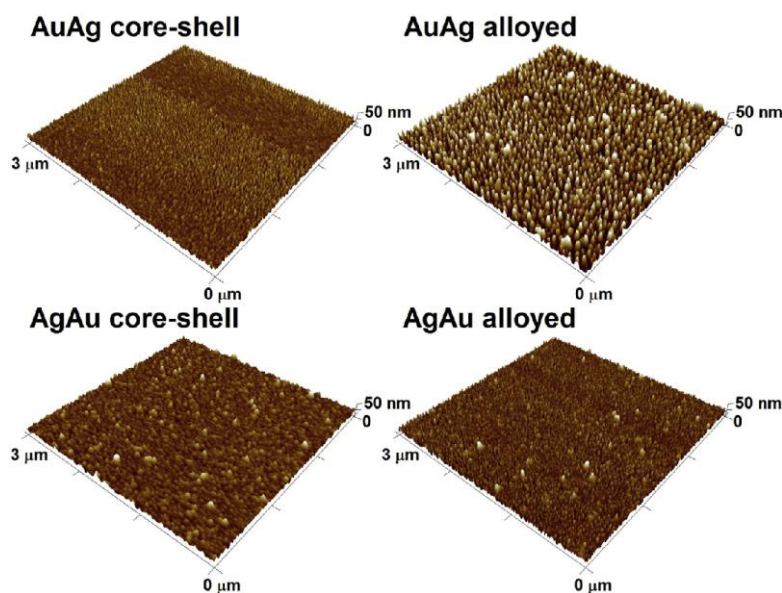


Figura 5. Imágenes AFM obtenidas para (izq.) sistemas core-shell de Au/micros y (der.) aleaciones de Au-Ag. Figura tomada de la referencia Kvitek 2020 [27].

2.3 Plasmones Ópticos

Los plasmones de superficie son oscilaciones colectivas de electrones libres en la superficie de un material metálico, inducidas por un campo electromagnético incidente [28]. Cuando estas oscilaciones se restringen a una pequeña región (por ejemplo, a la superficie de una nanopartícula metálica), se denominan plasmones de superficie localizados, cuya resonancia asociada, LSPR, se observa en la figura 6. En el caso de nanopartículas de metales nobles (p. ej.: Au o Ag), la interacción con la luz visible puede excitar estos plasmones localizados, dando lugar a fuertes absorciones o dispersión en longitudes de onda características (banda plasmónica). La condición de resonancia LSPR depende de varios factores: el tamaño y la forma de la nanopartícula; el material (propiedades dieléctricas del metal) y el índice de refracción del medio circundante. Ajustando estos parámetros es posible sintonizar la frecuencia de resonancia. Por ejemplo, nanopartículas más grandes, o de formas alargadas, presentan resonancias desplazadas hacia el rojo (mayor longitud de onda), mientras que partículas pequeñas o materiales con electrones más ligeros (como Ag) resuenan hacia el azul (menor longitud de onda).

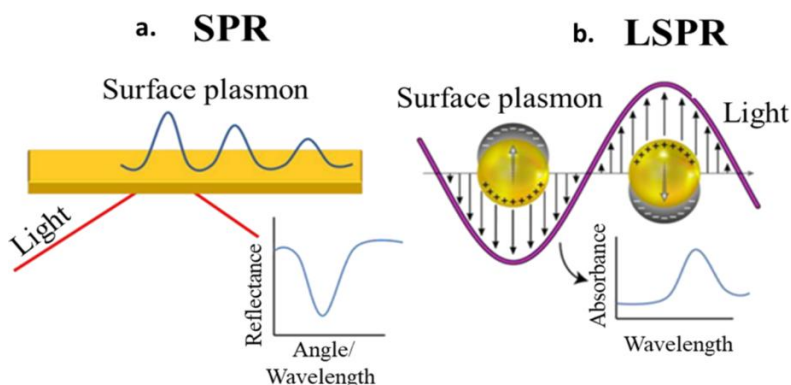


Figura 6. Representación esquemática de la excitación de plasmones de superficie: (a) SPR, onda de plasmones de superficie en una lámina metálica, y (b) LSPR, plasmones localizados en nanopartículas esféricas, mostrando los espectros típicos de reflectancia y absorbancia, respectivamente. Adaptado de J.-F. Masson, *Analyst*, 2020 [29].

En superficies metálicas rugosas, o agregados de nanopartículas muy próximos entre sí, ocurren fenómenos de acoplamiento plasmónico que pueden concentrar el campo electromagnético en regiones extremadamente pequeñas, denominadas *hot spots*. Un *hot spot* es una región de campo eléctrico localmente intensificado, típicamente en la unión o en el intersticio entre dos nanopartículas vecinas, o en las puntas de nanoestructuras con alta curvatura. Debido al acoplamiento de plasmón localizado, el campo eléctrico en un *hot spot* puede ser varias órdenes de magnitud más intenso que el campo incidente promedio. En otras palabras, la nanopartícula actúa como nanoantena: la radiación incidente induce la oscilación característica LSPR y genera un campo eléctrico cercano amplificado. Si una molécula se encuentra adsorbida, o muy próxima a esa región, experimentará la luz "como si" proviniese no solo de la fuente láser distante sino también de este campo local amplificado de la nanoestructura.

Estos *hot spots* son cruciales para la mejora SERS (tal como se describe en la siguiente sección), ya que la intensidad de señales Raman puede incrementarse exponencialmente gracias al campo cercano potenciado. Estudios de detección a nivel de molécula única han demostrado que, típicamente, la señal SERS medible proviene mayormente de moléculas ubicadas en *hot spots* con aumentos del campo electromagnético local del orden de $10^7 - 10^8$ veces. Por lo tanto, en aplicaciones de sensores basados en plasmónica, se busca diseñar sustratos o arreglos de nanopartículas que maximicen la densidad y la intensidad de estos sitios calientes, para obtener señales ópticas más intensas y detectables a bajas concentraciones (ver figura 7).

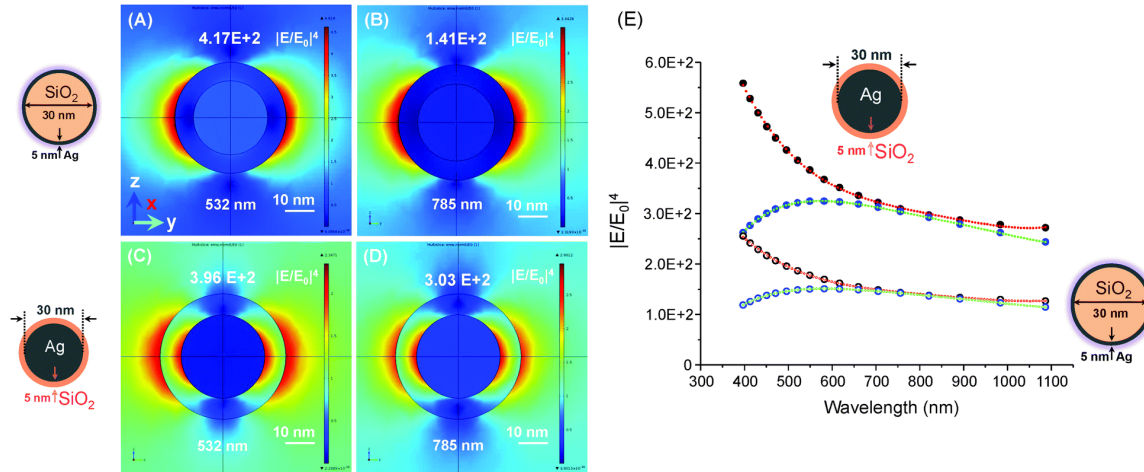


Figura 7. (A–D) Distribución del campo electromagnético alrededor de dos tipos de nanopartículas plasmónicas con geometría esférica: (i) núcleo de sílice (30 nm) y una delgada capa de plata (5 nm) y (ii) núcleo de plata (30 nm) y una delgada capa de sílice (5 nm), a dos longitudes de onda de excitación (532 nm y 785 nm). La onda electromagnética incidente es plana y se propaga a lo largo del eje z , con polarización a lo largo del eje y , y el eje x es perpendicular al plano xy . (E) Distribución calculada del factor de mejora SERS (EF) en la región de longitudes de onda de 400 nm a 1100 nm (Radziuk & Moehwald, 2015) [30].

Una de las manifestaciones observables de la LSPR es la banda de absorción óptica característica de las nanopartículas metálicas. En solución coloidal o depositadas sobre un sustrato, las NPs de oro y plata exhiben colores distintivos debidos a sus plasmones: el oro coloidal típicamente produce un color rojo rubí, mientras que la plata coloidal aparece amarillenta o marrón claro [31], [32], [33]. Es sabido que las nanopartículas esféricas de Au presentan su máximo de resonancia plasmónica alrededor de 520 nm (en el verde del espectro visible), mientras que las de Ag lo hacen alrededor de 420 nm (en el violeta), bajo condiciones típicas en medios acuosos. Estas posiciones corresponden a las longitudes de onda en las que se satisfacen las condiciones de resonancia LSPR para cada metal, considerando sus propiedades dieléctricas y la permitividad del medio circundante. Que el oro presente una frecuencia plasmónica resonante más baja que la de la plata se debe a diferencias en sus constantes ópticas intrínsecas. En el caso particular de la formación de aleaciones Au-Ag o de nanopartículas bimetales, la banda plasmónica resultante puede sintonizarse en posiciones intermedias entre las de los dos metales puros. Por ejemplo, en nanopartículas aleadas de composición 1:1 (Au:Ag equiatómico), se ha observado una banda de LSPR alrededor de 465 nm, que efectivamente cae entre los ~ 415 nm de Ag puro y ~ 524 nm de Au puro en similares condiciones. Ajustando la proporción de oro y plata en la nanopartícula, es

posible desplazar gradualmente la banda plasmónica a lo largo del espectro visible. Además de la composición, el tamaño influye: a mayor diámetro de partícula, suelen producirse un leve corrimiento al rojo y un ensanchamiento de la banda plasmónica debido a los efectos de radiación y de amortiguamiento por dispersión electrónica. La forma geométrica también induce múltiples bandas: por ejemplo, *nanorods* de Au exhiben dos resonancias (transversal, cerca de 520 nm, y longitudinal, en el rojo/NIR, cuya posición depende de la relación de aspecto). Este comportamiento se sustenta en investigaciones recientes realizadas por Bonvicini *et. al.* (ver figura 8) y Babawale *et. Al* [34], [35].

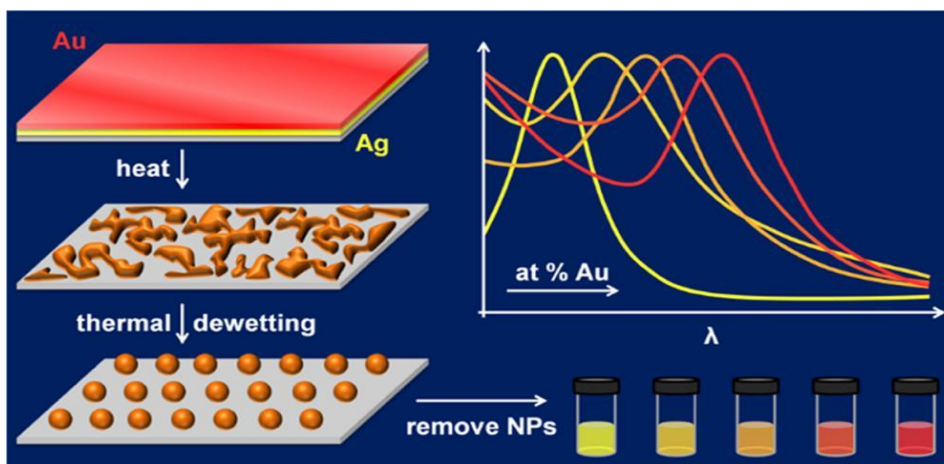


Figura 8. Formación de nanopartículas bimetálicas (NPs) mediante SSD a partir de bicapas de Ag/Au crecidas sobre Si. El espectro muestra el corrimiento del plasmón debido al aumento de Au.

En la práctica, las bandas plasmónicas proporcionan una firma rápida de la presencia de nanopartículas y permiten estimar cualitativamente sus propiedades. Por ejemplo, una muestra que revele una absorción máxima en $\sim 400\text{--}450$ nm sugiere NPs ricas en plata o de tamaño pequeño, mientras que máximos en $\sim 520\text{--}600$ nm indican la presencia de oro o de partículas más grandes. En un estudio, se reportó que el espectro UV-Vis de diversos nanosistemas de oro presentaba invariablemente una banda alrededor de 520 nm atribuida al LSPR, y que no se observó una tendencia clara entre el tamaño de partícula y el desplazamiento de dicha banda dentro de cierto rango. Esto implica que, si bien la posición exacta del pico puede variar ligeramente con el tamaño, la variación no es drástica a menos que se cambie significativamente la morfología o el medio.

2.4 Factor de Mejora (EF)

En SERS, la amplificación total de la señal es el producto de dos contribuciones: el mecanismo electromagnético (EM), dominado por la LSPR de nanoestructuras de Au/Ag que intensifica el campo cercano ($EF \propto |E|^4$), y el mecanismo químico (CM) asociado a la transferencia de carga de molécula-metal en la primera monocapa adsorbida. El EM suele ser el factor predominante y depende críticamente de la geometría y el espaciado, que rigen la formación de *hot spots*; por eso, controlar la morfología es esencial para maximizar la respuesta SERS.

Para comparar sustratos, se emplea el Factor de Mejora SERS (*EF*) definido por la ecuación estándar:

$$EF = \frac{I_{SERS}/C_{SERS}}{I_{Raman}/C_{Raman}} \quad (1)$$

donde I_{SERS} e I_{Raman} son las intensidades (o áreas) de una banda diagnóstica registradas con y sin mejora, y C_{SERS} e C_{Raman} son las concentraciones respectivas del analito. Todas las condiciones instrumentales (láser, objetivo, tiempo de integración, etc.) deben mantenerse idénticas al comparar las señales. Le Ru *et al* son quienes formalizaron cómo definir y calcular el EF que usamos hoy [36], [37], [38], [39]

Ma *et al.* evaluaron el EF usando la banda de R6G a 1512 cm^{-1} , comparando sustratos de AuNRs (nano-barras), NRs *core-shell* de Au@Ag (núcleo@cubierta) y NRs *core-shell* funcionalizadas con una molécula del grupo amino, Au@Ag@SiO₂-NH₂. Aplicaron la ecuación anterior con 1 nmol L^{-1} (SERS) frente a 1 mmol L^{-1} (Raman sin mejora), manteniendo constantes los parámetros de adquisición. Encontraron que el sustrato Au@Ag@SiO₂-NH₂ incrementó el área de la banda 2.0 y 12.9 veces respecto a Au NRs y Au@Ag NRs, respectivamente, atribuido a la capa de sílice ultrafina con *pinholes* que preserva la estabilidad y permite el contacto efectivo con el analito. Este procedimiento es el que se recomienda para validar nanoestructuras de Ag/Au, obtenidas a partir de SSD, empleando la Rodamina B como molécula sonda (ver figura 9) [40].

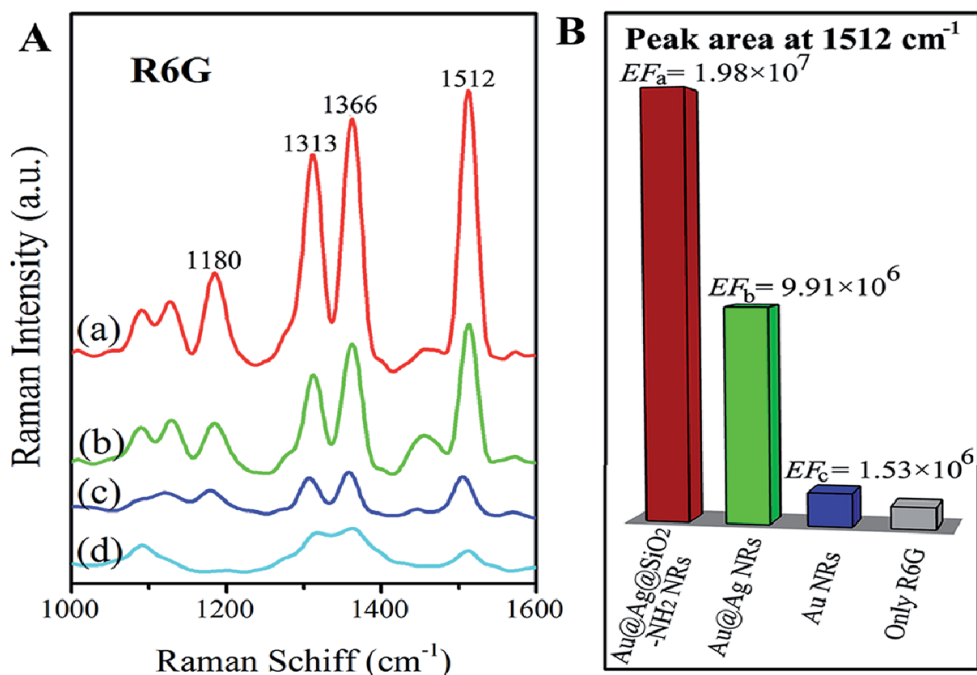


Figura 9. Cálculo del factor de realce SERS (EF) usando la banda de R6G a 1512 cm^{-1} . A) Espectros con tres sustratos: Au NRs, Au@Ag NRs y Au@Ag@SiO₂-NH₂ NRs (SERS a 1 nM) y espectro Raman sin realce (1 mM). B) Áreas de pico y su factor de mejora estimados mediante la relación EF. La capa de SiO₂ con *pinholes* mejora la estabilidad y el acceso molecular, lo que incrementa el EF. Reproducida de Ma *et al.*, RSC Adv. 2015, 5, 32168–32174. Figura tomada de [40]

Un sustrato SERS típico puede ser una película metálica rugosa, una nanoestructura periódica (p.ej. arreglos de tubos metálicos) o agregados coloidales de nanopartículas de Au-Ag. Lo importante es que presente abundantes sitios donde se generen *hot spots*. Bajo estas condiciones, se pueden detectar cantidades muy pequeñas de analito. De hecho, SERS ha demostrado sensibilidad hasta el nivel de detección de una sola molécula en sistemas optimizados, algo imposible de lograr con Raman convencional. Además, al utilizar metales nobles químicamente estables, SERS permite realizar detección en ambientes acuosos o complejos (p. ej. detección de biomoléculas, contaminantes, etc.) con mínima preparación de muestra. Por estas razones, SERS se ha vuelto una herramienta analítica poderosa, empleada en aplicaciones que van desde la identificación de explosivos y agentes tóxicos, hasta diagnósticos médicos y detección de biomarcadores, dado que combina alta sensibilidad y especificidad molecular.

2.5 Fundamentos de calibración y validación analítica

En cualquier aplicación analítica, ya sea basada en absorbancia óptica o en espectroscopía Raman, es fundamental establecer curvas de calibración para cuantificar la concentración de las especies de interés a partir de la señal medida. Una curva de calibración es la relación entre la respuesta instrumental (intensidad de señal) y la concentración del analito. En el contexto de este trabajo, podemos requerir calibraciones de dos tipos:

2.5.1 Calibración con banda plasmónica (LSPR)

Si se utiliza la absorbancia de la banda plasmónica de las nanopartículas (p. ej., la absorbancia a 520 nm para Au NPs) como señal analítica, se debe preparar una serie de estándares con concentraciones conocidas de nanopartículas o de la especie que modifique la banda (p.ej., un adsorbato o una especie química que se fija a la superficie de las nanoestructuras y cause un desplazamiento de la banda). Midiendo la absorbancia, o la posición de la banda, para cada estándar, se construye la curva absorbancia vs concentración. Esta gráfica permitirá luego interpolar la concentración de muestras desconocidas a partir de su absorbancia medida. En particular, es común observar una tendencia lineal entre la absorbancia plasmónica y la concentración de nanopartículas en un rango determinado, según la ley de Beer, que indica que la absorbancia a la longitud de onda de resonancia es proporcional a la concentración de nanopartículas en suspensión [41]. De igual modo, si la detección se basa en el desplazamiento de la banda LSPR en función de la concentración de un analito (como en sensores refractométricos plasmónicos), dicho desplazamiento puede calibrarse con concentraciones conocidas del analito. Un ejemplo de este análisis sistemático es la investigación desarrollada por McFarland *et al.* en 2003, donde se utiliza microscopía óptica de campo oscuro para demostrar la respuesta de la resonancia de plasmones de superficie localizada (λ_{max}) de nanopartículas individuales de plata (Ag) ante la formación de una monocapa de moléculas adsorbidas [42]. La adsorción de menos de 60000 moléculas de 1-hexadecanotiol en una sola nanopartícula de Ag de aproximadamente 60 nm de tamaño, produce un corrimiento de 40.7 nm en la resonancia plasmónica localizada [43]. Además, se demostró que la cinética de respuesta de la nanopartícula individual es comparable a la de otras tecnologías de sensores en tiempo real.

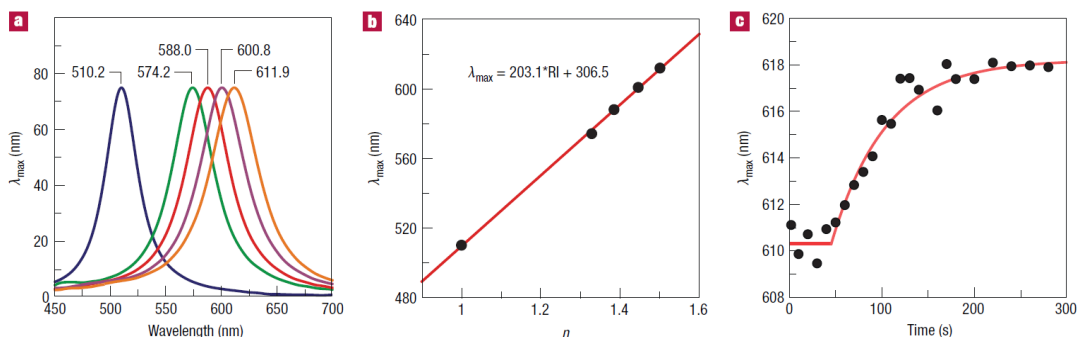


Figura 10. LSPR en un nanoprismo de plata individual. a) Espectros de dispersión Rayleigh resonante de una nanopartícula de plata individual en diferentes ambientes de solventes (de izquierda a derecha: nitrógeno, metanol, propanol-1, cloroformo y benceno). b) Gráfica que muestra la relación lineal entre el índice de refracción del solvente (n) y la longitud de máxima intensidad LSPR (λ_{max}). c) Monitoreo de la adsorción de octanotiol (1 mM) sobre una sola nanopartícula. Figura tomada de la referencia [42].

2.5.2 Calibración con intensidad SERS

En métodos SERS, la señal cuantitativa suele ser la intensidad de una banda Raman característica del analito (por ejemplo, la altura o área de un pico Raman específico). Para obtener una curva de calibración, se miden espectros SERS de soluciones (o muestras) con concentraciones conocidas del analito y se extrae la intensidad de la banda de interés en cada caso. Al representar la intensidad SERS en función de la concentración, se obtiene la curva de calibración SERS. Típicamente, a bajas concentraciones la relación es lineal, pero puede desviarse de la linealidad a concentraciones mayores por saturación de sitios de adsorción o efectos de agregación [44]. La parte lineal de la curva define el rango lineal útil para cuantificación. Con la ecuación de calibración (ecuación lineal de la forma $I = mC + b$), es posible determinar concentraciones desconocidas (C) invirtiendo la relación (restando la intercepción b y dividiendo por la pendiente m sobre la intensidad I). La literatura aconseja, además, reportar los coeficientes de determinación (R^2) de dichas rectas de calibración para indicar la calidad y precisión de la cuantificación SERS lograda. Este método de cuantificación del analito se presenta en la figura 11.

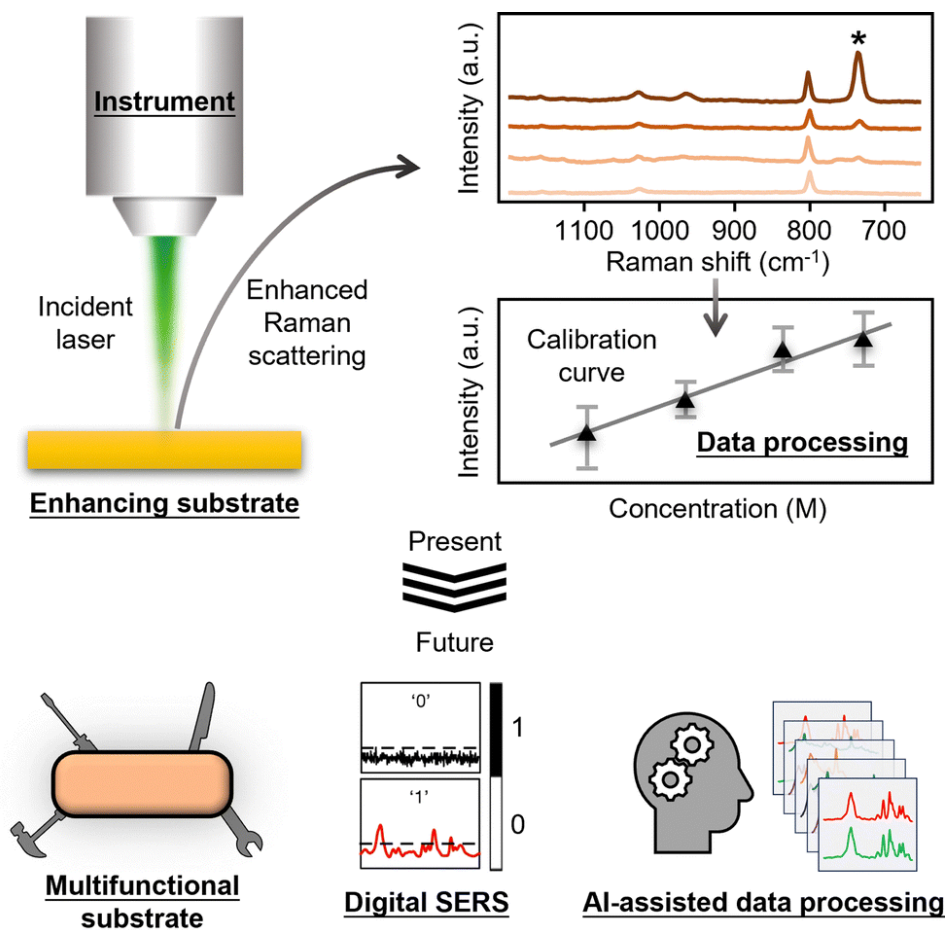


Figura 11. Ilustraciones esquemáticas que muestran el instrumento Raman, el sustrato realzador y el procesamiento de datos como los tres componentes esenciales en la cuantificación por SERS, así como el posible desarrollo futuro de cada componente. Adaptado con permiso de la ref. 20, copyright Springer Nature 2024.

Es importante señalar que, en SERS, debido a la posible variabilidad de los sustratos y a la distribución de *hot spots*, a veces se emplean estándares internos o la normalización de la señal para mejorar la reproducibilidad cuantitativa. No obstante, para fines de este trabajo de tesis (curvas de calibración iniciales en laboratorio), se asume que, bajo condiciones controladas (mismo sustrato SERS y mismo procedimiento), la intensidad SERS es lo suficientemente reproducible como para trazar una curva confiable. De hecho, se considera esencial en un experimento cuantitativo SERS extraer la intensidad de la banda objetivo y representarla contra la concentración para obtener la calibración. Esto permite posteriormente, al medir muestras problema, interpolar su concentración a partir de la intensidad Raman observada, de forma análoga a otras técnicas analíticas.

3 Estado del Arte

3.1 Mercurio en agua: especies y normativas

El mercurio (Hg) es un metal pesado de monitoreo priorizado en aguas continentales debido a su alta toxicidad y su capacidad de bioacumulación. En medios acuosos, predomina como mercurio inorgánico en su estado divalente (Hg^{2+}), que puede formar complejos con aniones como Cl^- y OH^- . La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un límite máximo de $6 \mu g L^{-1}$ de Hg total en agua potable [5], mientras que en Colombia el Decreto 1575/2007 fija un máximo de $1 \mu g L^{-1}$ para Hg^{2+} [45].

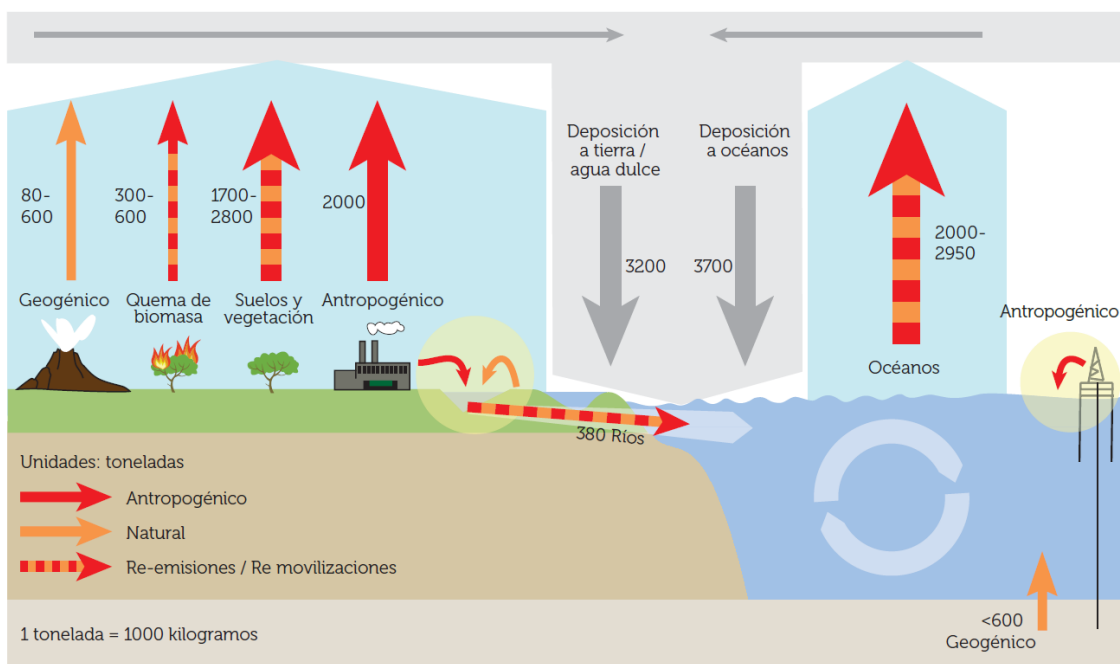
Las principales fuentes de Hg en ríos y lagos son:

1. La minería artesanal y drenaje ácido de minas
2. Los vertimientos industriales
3. La lixiviación de agroquímicos

Una vez liberado al medio acuático, el Hg^{2+} puede ser transformado, por reacciones biogeoquímicas, en sedimentos más tóxicos y bioacumulables tales como el metilmercurio (MeHg), que se incorpora a organismos y se biomagnifica a lo largo de la cadena trófica, causando efectos neurotóxicos y renales en fauna acuática y en el ser humano.

En la figura 12, se aprecia el ciclo del mercurio, donde se identifican las principales fuentes, rutas y procesos de emisión, transporte, deposición y reciclaje del mercurio a nivel global. Se destacan las emisiones naturales (como las de los volcanes), las antropogénicas (industria y quema de biomasa) y las reemisiones de suelos, vegetación y océanos. También se ilustra cómo el mercurio se transporta por los ríos y la atmósfera, depositándose finalmente en la tierra, el agua dulce y los océanos. El ciclo resalta la importancia de controlar las emisiones humanas para reducir la acumulación de mercurio en los ecosistemas. Adaptado de UNEP (2013).

El mercurio, en su estado iónico divalente (Hg^{2+}), es reconocido como uno de los contaminantes más peligrosos en el ambiente acuático y en la biosfera [1]. Aún en cantidades ínfimas, el Hg^{2+} no se biodegrada y tiende a acumularse en las cadenas tróficas, representando un riesgo serio para los ecosistemas y la salud humana. La exposición crónica al mercurio se ha vinculado con trastornos neurológicos graves, incluyendo afectaciones cognitivas, neurodegenerativas (como la demencia o la enfermedad de Alzheimer) e incluso una posible relación con trastornos del desarrollo, como el autismo [4], [46]. Debido a la alta toxicidad del mercurio y a su amplia distribución en el medio ambiente, existe un gran interés en desarrollar sensores capaces de detectar trazas de Hg^{2+} de forma rápida y confiable. De hecho, organismos internacionales y normativas ambientales han establecido límites muy estrictos para el mercurio en aguas de consumo: típicamente se permiten concentraciones del orden de micro a pico-molar, es decir, partes por billón o menos. Detectar Hg^{2+} a esos niveles ultrabajos representa un desafío analítico importante.



Fuente: UNEP, 2013a.

Figura 12. La figura muestra el ciclo urbano del mercurio y sus vías de emisión, transporte, deposición y transformación en los ecosistemas acuáticos.

3.2 Métodos analíticos convencionales para la detección de analitos.

Como se mencionó anteriormente, los métodos tradicionales para la cuantificación de metales pesados (AAS y ICP-MS) ofrecen gran exactitud y sensibilidad, pero requieren equipamiento costoso, procedimientos de pretratamiento de muestra laboriosos y personal altamente especializado. Además, técnicas colorimétricas o de resonancia de dispersión se han explorado para la detección de Hg^{2+} , pero suelen verse limitadas por sensibilidades insuficientes a nivel de trazas [41]. En este contexto, existe una necesidad vigente de nuevos métodos analíticos que sean sensibles, selectivos y portátiles, con la sensibilidad y la selectividad requeridas para el monitoreo *in situ* de mercurio en muestras ambientales.

3.3 SERS para sensado de Hg^{2+} tipo *turn-off*

La espectroscopía Raman intensificada por superficie (SERS) ha emergido en los últimos años como una alternativa poderosa para la detección de contaminantes metálicos en trazas [40], [47]. Para la detección de iones metálicos como Hg^{2+} , SERS ofrece ventajas claras: es un método rápido (análisis en minutos), de alta sensibilidad y potencialmente adaptable a sensores portátiles. Estas características han motivado un creciente número de investigaciones orientadas a desarrollar sensores SERS para la detección de mercurio que complementen o incluso reemplacen las técnicas tradicionales en aplicaciones de campo.

Una de las aproximaciones más sencillas es la detección directa de Hg^{2+} sin marcadores (*label-free*), aprovechando interacciones químicas o físicas entre el ion mercurio y un sustrato SERS, que alteran la señal Raman de determinada especie al ser adsorbida. Un ejemplo es el trabajo de Ren et al. (2012), que estableció un modelo simple y didáctico de cómo la química específica del mercurio puede traducirse en una pérdida sistemática de señal SERS, demostrando que el Hg^{2+} puede detectarse directamente en una dispersión de nanopartículas de plata + citrato mediante un mecanismo de señal *turn-off* [25]. En presencia de concentraciones muy bajas de Hg^{2+} (subnanomolar), observaron una disminución notable en la intensidad SERS de las bandas del citrato en un tiempo de aproximadamente 2 min. Este efecto se atribuyó a dos procesos complementarios: (i) la formación de un complejo de coordinación entre Hg^{2+} (catión metálico) y un ligando con pares de electrones disponibles (en este caso, el citrato) estabiliza las nanopartículas, y (ii) la formación de una amalgama Ag–Hg en la superficie de las nanopartículas, debido a la reducción *in situ* del Hg^{2+} . Ambos fenómenos producen cambios en la resonancia plasmónica de las nanopartículas de plata (atenuando su intensidad en el campo cercano) y reducen la absorción Raman en la superficie metálica de la especie testigo o del marcador. Debido a esta interacción, el sensor presentaba una alta sensibilidad. Ren et al. reportaron un límite de detección de Hg^{2+} de aproximadamente 9×10^{-11} M (90 pM, equivalente a ~ 18 ppt) en agua, mejorando los valores previos en la literatura para la detección SERS directa de mercurio [25]. Este estudio dejó en claro que es factible detectar Hg^{2+} sin necesidad de etapas de reconocimiento molecular complejas, aprovechando la química única del mercurio (su afinidad por la plata y tendencia a formar amalgamas) para inducir cambios medibles en la señal SERS.

También se han explorado estrategias híbridas que combinan SERS con otras señales para la detección de Hg^{2+} . Por ejemplo, Zhao et al. (2021) propusieron un sensor colorimétrico-SERS dual basado en el grabado controlado de nanopartículas Au@Ag en presencia de mercurio [18]. En este método, las nanopartículas Au@Ag se funcionalizaron con un reactivo (ion tiosulfato) que permanece inerte hasta que se introduce Hg^{2+} . El Hg forma amalgama preferentemente con la cubierta de plata y cataliza su disolución, lo que provoca tanto un cambio de color visible (de amarillo a rojizo, por la exposición del núcleo de oro) como una variación en la señal SERS de un marcador adsorbido. Esta estrategia dual permitió detectar Hg^{2+} con alta sensibilidad en agua, aprovechando la simplicidad de la detección colorimétrica para alertar visualmente y la cuantificación precisa mediante SERS.

3.4 Ag-Au por SSD sobre BSG: resultados y vacíos de conocimiento

Un aspecto crucial en el desempeño de cualquier sensor SERS es el sustrato nanoestructurado que provee la amplificación Raman. Tradicionalmente se han usado nanopartículas monometálicas de oro o plata. Sin embargo, recientemente ha surgido interés en emplear nanoestructuras bimetálicas Au/Ag que combinan lo mejor de ambos metales (la estabilidad química del oro y la alta actividad SERS de la plata). En particular, varias investigaciones han explorado métodos físicos para fabricar capas nanométricas bimetálicas sobre sustratos sólidos (ej. vidrio borosilicato (BSG)) a través de tratamientos térmicos controlados tales como el SSD.

Kvítek et al. (2020) fabricaron nanoestructuras bimetálicas Au/Ag sobre vidrio mediante SSD, ajustando la secuencia de deposición y el tratamiento térmico para obtener nanoclústeres bien diferentes: unos de aleación Au-Ag homogénea y otros de tipo *core-shell*. Sus resultados, caracterizados mediante SEM, AFM y espectroscopía UV-Vis, evidenciaron que la introducción

de un segundo metal permite un ajuste fino de la longitud de onda de resonancia plasmónica de las nanoestructuras [48]. Según las condiciones de preparación, lograron desplazar el pico de la banda plasmónica desde aproximadamente 400 nm (típico de Ag nanométrica) hasta 650 nm (típico de Au más grande), e incluso obtener muestras con doble banda plasmónica (contribuciones de Au y Ag simultáneas) bajo ciertas configuraciones. Esto es muy ventajoso para explotar plasmones, ya que permite sintonizar el sustrato SERS con la longitud de onda de la excitación óptima del láser y con el rango espectral del analito objetivo, maximizando así la intensidad Raman. En trabajos afines, se ha reportado que las nanoaleaciones Au-Ag bien controladas pueden ofrecer factores de mejora SERS superiores a las partículas monometálicas debido a efectos de composición optimizada. Un desafío con la plata es su tendencia a oxidarse durante tratamientos térmicos; para abordar esto, recientemente Lipovskii et al. (2022) propusieron un enfoque ingenioso: primero formar nanopartículas de Au en el vidrio, luego introducir iones Ag^+ en el vidrio vía intercambio iónico (sumergiendo el vidrio en una sal fundida de AgNO_3), y finalmente recocer nuevamente la muestra [49]. Mediante esta ruta de difusión, lograron formar nanopartículas de aleación Au/Ag directamente dentro de la matriz vítrea, de forma estable, evitando la oxidación superficial del Ag. Además, demostraron que, variando la temperatura de tratamiento térmico, se controla la proporción de plata incorporada a las partículas, lo que permite desplazar la posición de la banda de LSPR de ~ 500 a 570 nm a voluntad. Este nivel de control permite ajustar, a voluntad, el sustrato SERS según las necesidades (por ejemplo, centrar la resonancia donde cierto contaminante presenta su máxima respuesta Raman o donde el láser utilizado tiene mayor eficiencia).

Ahora bien, la pregunta relevante es si este tipo de plataformas bimetalicas Au/Ag sobre vidrio, preparadas por SSD, han sido empleadas para la detección de Hg^{2+} y si en ellas se ha estudiado la evolución de la banda plasmónica y el tiempo de respuesta del sensor. De acuerdo con la revisión de la literatura realizada, hasta el momento no se han publicado trabajos enfocados en la detección de Hg^{2+} con sustratos Ag-Au nanoestructurados, vía SSD y soportados sobre vidrio [48]. La mayoría de los estudios, como los descritos anteriormente, se centran en la fabricación y caracterización óptica de las nanoestructuras (por ejemplo, midiendo la posición de la banda LSPR y la morfología resultante), e incluso algunos evalúan actividad SERS usando moléculas modelo (típicamente colorantes como Rodamina 6G o similares) para comprobar la mejora, pero no abordan pruebas analíticas con iones mercurio. Adicionalmente, tampoco se reportan en la literatura tiempos de respuesta específicos para la detección de Hg^{2+} usando estos sustratos bimetalicos. Es razonable suponer que, si se funcionaliza un sustrato Au-Ag con un ligando adecuado (por ejemplo, un tiol quelante de Hg), podría detectarse el ion con una rapidez comparable a otros sensores SERS, posiblemente en minutos. De hecho, recordemos que en un sistema de NP de Ag simples se observó respuesta prácticamente instantánea (2 minutos) a Hg^{2+} debido a la amalgama. En un sistema bimetalico Au/Ag, cabría esperar una interacción análoga o incluso más rápida con Hg^{2+} dado que la plata superficial reaccionaría inmediatamente con el mercurio. Sin embargo, faltan aún estudios que verifiquen experimentalmente la cinética de respuesta (tiempo para alcanzar señal estable) en este tipo de sustratos híbridos. Este vacío en la literatura sugiere una oportunidad de investigación: combinar las ventajas de los sustratos bimetalicos ajustables con una prueba específica para Hg^{2+} , monitoreando no solo la sensibilidad sino también la dinámica de detección (por ejemplo, cuánto tarda la señal SERS en decaer o aparecer tras exponer el sensor al analito).

4 Metodología Experimental

4.1 Fabricación de películas bimetálicas

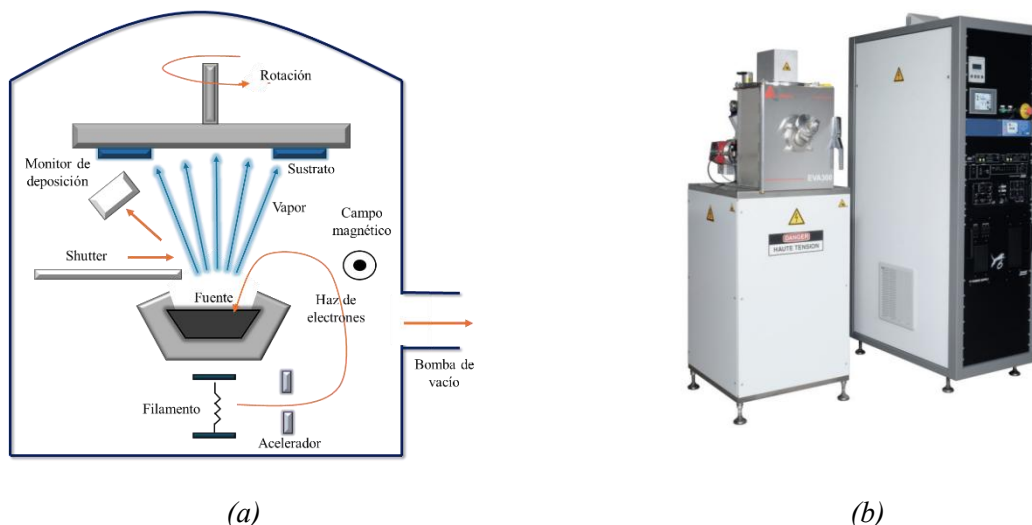


Figura 13. (a) Esquema conceptual del proceso de deposición por evaporación física en fase vapor asistida por haz de electrones (e-beam PVD), donde un haz de electrones incide sobre el material fuente provocando su evaporación en condiciones de alto vacío. (b) Fotografía del sistema de evaporación Alliance Concept EVA300 utilizado para el crecimiento de películas delgadas. A la izquierda se observa la cámara de vacío con la fuente de evaporación y el portamuestras; a la derecha, el panel de control para regular los parámetros del proceso (presión, potencia y tasa de deposición).

La deposición de las películas delgadas bimetálicas Ag–Au se realizó mediante evaporación física en fase de vapor asistida por haz de electrones (*electron-beam evaporation*, e-beam PVD). En este método, un haz de electrones de alta energía se enfoca sobre el material fuente, generando calentamiento localizado, evaporación y posterior transporte de los átomos hacia el sustrato en condiciones de alto vacío. Este proceso permite la formación de películas delgadas de alta pureza, con un control preciso del espesor y una contaminación mínima [50]. El principio de operación del sistema empleado se ilustra en la Figura 13(a), donde se muestra el esquema conceptual del proceso de evaporación mediante haz de electrones en una cámara de vacío. En este sistema, el material metálico se calienta mediante bombardeo electrónico, mientras que los átomos evaporados se transportan en régimen de flujo libre molecular hacia el sustrato, donde se condensan y forman la película.

El proceso experimental se llevó a cabo en un sistema comercial de evaporación (Alliance Concept EVA300), mostrado en la Figura 13(b), operando a una presión base del orden de 5×10^{-7} mbar, alcanzada mediante un sistema de bombeo turbomolecular. Estas condiciones reducen significativamente las colisiones entre las especies evaporadas y el gas residual, lo que favorece una deposición uniforme y reproducible [51].

Durante la deposición, los sustratos de vidrio borosilicato (BSG) fueron montados sobre un portamuestras con rotación (~ 10 rpm) para mejorar la uniformidad del recubrimiento. La tasa de deposición y el espesor de las películas fueron monitoreados en tiempo real ($5 \text{ \AA/s}$, equivalente a

0.5 nm/s) mediante una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), lo que permitió un control preciso del crecimiento capa a capa [52].

Las películas bimetálicas de Ag/Au se depositaron sobre obleas de vidrio de borosilicato con un diámetro de 50 mm. Posterior al depósito, cada oblea se secciona en sustratos de 10 mm × 10 mm mediante una cortadora láser de vidrio, lo que permite obtener múltiples réplicas o ensayos a partir de una misma oblea. Además, se utilizaron tres sistemas (S1, S2 y S3), cada uno con una configuración distinta.

Las tres configuraciones de espesor de las plataformas de Ag/Au, en nm, son: para el sistema 1, **10/20 nm**; para el sistema 2, **15/15 nm**; y para el sistema 3, **20/10 nm**. Como se puede observar, en las tres, el espesor total de las bicapas se mantiene constante en 30 nm (ver figura 14).

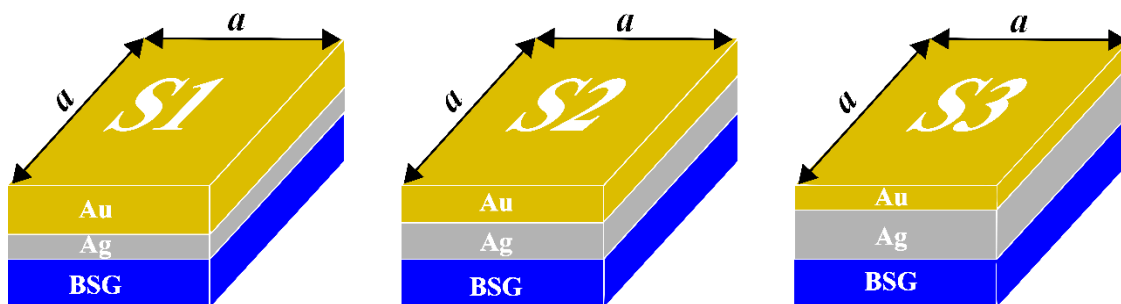


Figura 14. Representación esquemática de las plataformas bimetálicas Ag/Au depositadas mediante apilamiento secuencial de capas sobre vidrio de borosilicato (BSG, borosilicate glass). En estas plataformas se evalúan la actividad SERS y su desempeño como sensores de mercurio inorgánico (Hg^{2+}).

Previo al depósito por evaporación térmica, los sustratos de borosilicato se preparan mediante una limpieza secuencial para asegurar una superficie reproducible y minimizar contaminantes que alteren la cinética de crecimiento: (i) baños ultrasónicos en acetona y luego etanol (10 min cada uno), (ii) tratamiento oxidante tipo piraña ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$, 10 min), (iii) enjuague exhaustivo con agua ultrapura (Milli-Q) y secado con N_2 , seguido de un horneado suave (100°C , 30 min) para reducir especies fisisorbidas y estabilizar la superficie. M. El-Shabasy y F. S. Honeycy establecen en sus trabajos de investigación cómo este proceso es determinante en el crecimiento de películas policristalinas e inicia cuando las especies del vapor se adsorben en la superficie y, a temperatura finita, se difunden mediante un camino aleatorio a lo largo del sustrato hasta formar núcleos e islas; por tanto, capas adventicias (capas de películas ultrafinas no deseadas que se forman espontáneamente sobre el sustrato), partículas o residuos orgánicos modifican la energía superficial efectiva, la probabilidad de absorción de los átomos metálicos en la superficie (el *sticking*), y las barreras de difusión, alterando la densidad de nucleación y la posterior coalescencia o percolación [53], [54].

En la evaporación térmica resistiva, la potencia eléctrica aplicada a la fuente produce calentamiento por efecto Joule. Al elevar la temperatura del metal, aumenta su presión de vapor y se genera un flujo atómico/molecular que sale de la fuente. El flujo y la tasa de depósito dependen de la temperatura y de la geometría de la fuente (distancia fuente–sustrato) y de la presión residual (colisiones) [4]. Lo que ocurre en condiciones de alto vacío: el vapor se desplaza con pocas colisiones (régimen molecular), lo que favorece un transporte unidireccional hacia el sustrato. Esto

sustenta la idea de la línea de visión “*line-of-sight*” típica de la evaporación y explica por qué la orientación/rotación del sustrato afecta la uniformidad [55].

Cuando los átomos llegan al sustrato, se adsorben, difunden superficialmente (si hay energía térmica suficiente), forman núcleos y crecen hasta coalescer en islas y, finalmente, en una película continua. El mecanismo de formación de películas delgadas de Ag depositadas sobre SiO₂ a diferentes espesores nominales (expresados en monocapas, ML), lo que ilustra su progresión típica. El modo de crecimiento (capa a capa, islas 3D o mixto) depende del equilibrio entre las energías superficiales e interfaciales, la movilidad superficial y las condiciones del proceso; estos mecanismos se explican con mucha claridad en textos de ciencia de películas delgadas [56]. En este caso, el mecanismo es análogo a la secuencia de proceso: condensación → nucleación → crecimiento de islas → coalescencia → percolación → película continua, lo que constituye y define de manera crítica el origen directo de la morfología nano/micro (tamaño de isla, rugosidad efectiva, conectividad, distribución de huecos y cuellos metálicos) y, por tanto, de las propiedades ópticas y electromagnéticas relevantes para sensado que revelarán las plataformas S1–3 como sensores tipos SERS de Hg²⁺.

4.2 Protocolo de evaporación

El depósito de cada capa metálica (Ag o Au) mediante evaporación térmica resistiva se realiza mediante una secuencia controlada de potencia (desgasado/preevaporación → estabilización → depósito) para alcanzar un flujo estable y reproducible antes de iniciar el crecimiento efectivo sobre el sustrato. En la figura 15, se aprecia el diagrama de variación del porcentaje de potencia en función del tiempo para el depósito de las capas de Ag y Au, respectivamente. Durante todo el proceso, la tasa de depósito y el espesor nominal se monitorearon *in situ* a través del **QCM**, registrando la medida de la masa por unidad de área superficial depositada a partir del desplazamiento de la frecuencia de resonancia; bajo la aproximación clásica de película delgada y rígida, dicha relación se describe mediante la relación de Sauerbrey, permitiendo convertir el cambio de la frecuencia (Δf) en masa/espesor usando la densidad del material y la constante del cristal [57], [58]. En la figura 16 se muestra el protocolo, el cual consta de cinco etapas: (1) desgasado (*outgassing*) a 1% durante 1:00 min, (2) rampa intermedia hasta 18% en 0:30 min, (3) rampa final hasta 32% en 1:30 min, (4) depósito controlado a 32% manteniendo la tasa en 5.0 Å/s durante el tiempo requerido para alcanzar el espesor nominal, y (5) apagado y enfriamiento con descenso de potencia a 0% durante 1:00 min (en vacío) hasta temperatura segura. (Esquema representativo; el tiempo de la etapa 4 depende del espesor objetivo).

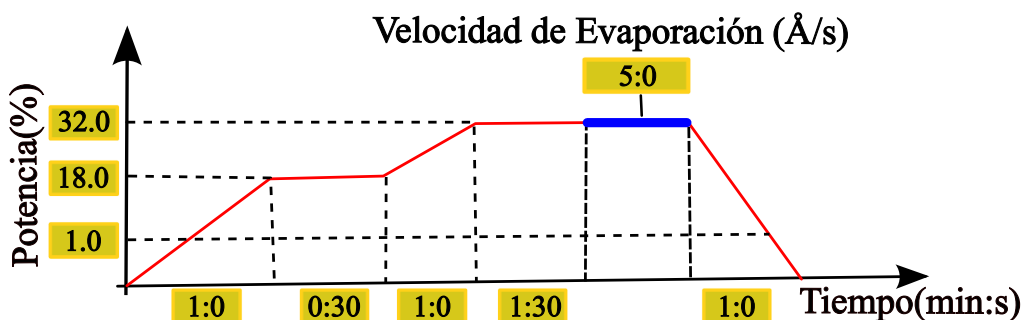


Figura 15. Diagrama temporal del protocolo de evaporación térmica resistiva para el depósito de cada capa metálica (Ag o Au), que muestra la evolución de la potencia aplicada (%) en función del tiempo (min: s) hasta alcanzar una tasa de evaporación objetivo de 5 Å/s (0.5 nm/s).

En esta dirección, establecer un flujo claro de proceso→propiedad→desempeño SERS hace indispensable caracterizar las películas mediante mecanismos como: (i) SEM, para cuantificar la cobertura, el tamaño y la densidad de islas, la coalescencia y la percolación (morfología y continuidad); (ii) AFM, para medir la rugosidad (correlacionar la topografía con los sitios de intensificación local); y (iii) UV–Vis, para seguir la evolución de las bandas LSPR/SPR y su compatibilidad espectral con la longitud de onda de excitación Raman. Esta tríada (SEM–AFM–UV/Vis) permite justificar de forma sólida por qué una condición de depósito (espesor/tasa) conduce a una morfología y una respuesta óptica específicas, y por qué ello se traduce en una actividad SERS determinada y reproducible tal como se estableció en el marco teórico de este trabajo de investigación [59]. Asimismo, se describirá el equipo Raman empleado para evaluar la actividad de SERS de las plataformas, su funcionamiento y parámetros operacionales.

4.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La adquisición de mapas de altura (topografía) mediante microscopía de fuerza atómica (*AFM*, por sus siglas en inglés) para cuantificar la morfología superficial de las películas de Ag/Au utilizadas como plataformas SERS. A partir de las imágenes, se estimaron la rugosidad cuadrática media (Ra) y el tamaño de grano promedio (D) mediante el procesamiento en Gwyddion. La técnica de AFM permite medir la topografía a escala nanométrica, ya que registra la interacción punta–superficie mediante la deflexión de un cantiléver y reconstruye un campo de alturas con resoluciones laterales y verticales muy altas. Un microscopio de fuerza atómica típico consta de:

1. Cantiléver + punta (tip): la punta barre la superficie; su geometría condiciona la resolución lateral y puede “ensanchar” los rasgos (convolución).
2. Sistema de detección (usualmente, palanca óptica): un láser se refleja en el cantiléver y un fotodiodo registra los cambios en la deflexión.
3. Escáner piezoeléctrico (XYZ): posiciona la muestra o la punta con precisión nanométrica.
4. Controlador + lazo de realimentación: mantiene constante una condición de interacción (fuerza, amplitud o fase, según el modo).

En este, un láser incide sobre la parte posterior del cantiléver y su reflexión se registra en un fotodiodo de posición; la señal de deflexión (o, según el modo, de amplitud/fase) alimenta el lazo de realimentación que ajusta el desplazamiento en Z del escáner piezoeléctrico durante el barrido XY, generando mapas de altura reproducibles (ver figura 16).



Figura 16. a) Fotografía del sistema AFM empleado en el Centro de Investigación y Desarrollo del SENA–SENNOVA (Cali). (b) Esquema del principio de operación (esquema adaptado de Oxford Instruments [60])

Para este trabajo, las imágenes de AFM se tomaron en el Centro de Investigación y Desarrollo del SENA–SENNOVA (Cali). Utilizando los siguientes parámetros de operación:

- Modo de imagen: sin contacto (define qué “fuerza efectiva” controla el lazo).
- Área de escaneo y muestreo de puntos: $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, resolución de 256×256 .
- Velocidad de escaneo (*scan rate*): 0.53 Hz
- Modo de imagen: AC
- Rango Z y escala de color: $\pm \sim 15\ \text{nm}$
- Punta/cantiléver: AC240TS-R3 (material: Si, recubrimiento: Al), radio de punta: $\sim 7\ \text{nm}$.

Para el procesamiento de las imágenes de AFM se emplea el software Gwyddion, el análisis reproducible de rugosidad y tamaño de grano/islas parte de importar la topografía AFM, verificar que las unidades sean coherentes (XY en μm y Z en nm) y luego aplicar una corrección de fondo (*levelling*) limitada—por ejemplo, eliminar la inclinación global o los desfases línea a línea—, dejando explícito qué operación se usó para no sesgar la rugosidad. Con la topografía ya corregida, la rugosidad se cuantifica mediante parámetros areales recomendados por la literatura y por estándares modernos, como la rugosidad cuadrática media (R_a), calculada sobre el área completa o sobre una ROI definida. Para estimar el tamaño de grano/islas (D), se genera una máscara de segmentación y sobre los objetos segmentados se obtienen distribuciones de altura y diámetro equivalente $D = 2\sqrt{A/\pi}$ a partir del área proyectada; finalmente, se reporta el criterio de segmentación y se mantiene constante entre muestras para asegurar comparabilidad.

4.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (*SEM*, por sus siglas en inglés) y los análisis composicionales por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (*EDS*, por sus siglas en inglés) se obtuvieron en el Instituto de Investigación en Ciencias Óhmicas (i-Ómicas) de la Pontificia Universidad Javeriana (Cali), empleando un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FE-SEM) TESCAN, modelo CLARA (ver figura 17). Este tipo de instrumentación permite la caracterización morfológica y superficial desde la escala micrométrica hasta la nanométrica, basada en la formación de imagen mediante la interacción haz-muestra y en la detección de señales electrónicas.

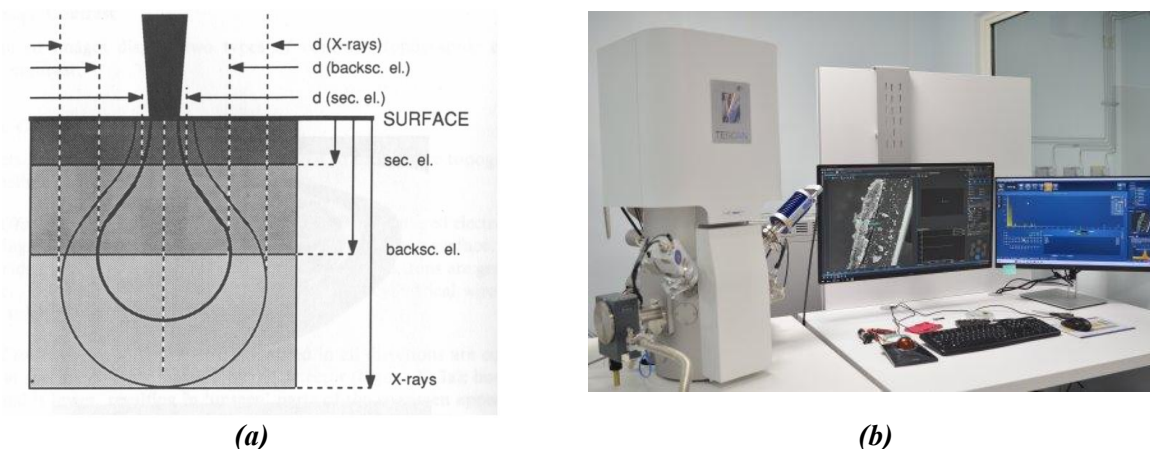


Figura 17. (a) Esquema conceptual del SEM que muestra la interacción haz-muestra y el origen de las señales SE, BSE y de rayos X (EDS). El diagrama relaciona el tipo de señal con el tipo de contraste (topográfico vs. composicional) empleado en esta tesis. Figura tomada de [61]. (b) Fotografía del microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) TESCAN CLARA del Instituto i-Ómicas (Pontificia Universidad Javeriana). Se muestra el conjunto del instrumento (columna y cámara de muestra) y su configuración general de operación. (Fuente: fotografía propia / cortesía de i-Ómicas / fabricante, según corresponda).

De acuerdo con la información institucional del equipo, el FE-SEM CLARA ofrece capacidad de imagen en ultra-alta resolución (UHR) y dispone de modalidades de operación (alto y bajo vacío) útiles para el análisis de muestras con tendencia a cargarse.

Este microscopio forma imágenes al barrer la superficie de la muestra con un haz de electrones enfocado. La interacción del haz con el sólido produce varias señales (ver figura 17-a); las más relevantes para morfología son:

- Electrones secundarios (*SE*, por sus siglas en inglés): Se generan muy cerca de la superficie (~ 100 nm). Son muy sensibles a la topografía de la superficie, lo que genera un alto contraste topográfico.
- Los electrones retrodispersados (*BSE*, por sus siglas en inglés) provienen de una mayor profundidad (~ 1 μ m). La cantidad de BSE generados depende del número atómico (Z) de los elementos de la muestra. Las áreas con elementos de alto Z se ven más brillantes, lo que proporciona contraste composicional.
- Rayos X Característicos (*EDS*): Se generan a profundidades aún mayores (~ 10 μ m). La energía de estos rayos X es única para cada elemento, lo que permite el análisis químico elemental mediante EDS.

Adicionalmente, esta interacción genera rayos X característicos, cuya detección mediante EDS permite identificar elementos químicos, estimar aproximadamente las fracciones en masa y obtener mapas de distribución elemental en el área inspeccionada [10].

En este trabajo, las imágenes SEM se emplean para realizar análisis cualitativos y cuantitativos de: (i) cobertura superficial, (ii) tamaño y densidad de islas metálicas, (iii) coalescencia y (iv) aproximación a la percolación y la continuidad de la película, parámetros directamente vinculados con la evolución morfológica de películas metálicas delgadas sobre sustratos débilmente interactuantes.

Las plataformas SERS se montaron sobre un *stub* metálico usando cinta de carbono conductora, procurando mantener la continuidad eléctrica entre la zona metalizada y el soporte para minimizar artefactos de carga (distorsión de contraste y/o pérdida de resolución). Cuando fue necesario (por carga o inestabilidad), se consideró el uso de condiciones instrumentales que reduzcan la carga (p. ej., bajo keV, ajustes de corriente o un modo de vacío apropiado), sin introducir modificaciones que alteren la superficie funcional.

Para disminuir la contaminación orgánica (hidrocarburos), se evitó el contacto directo con la zona activa y se mantuvieron las muestras en contenedores limpios antes del análisis. En EDS, estos contaminantes pueden reflejarse como señal de carbono y deben discutirse con cautela (p. ej., carbono proveniente de cinta o de pintura conductora o de adsorbatos).

Para que la comparación entre muestras sea sólida, el criterio consiste en estandarizar las condiciones de adquisición por lote y reportarlas de forma trazable. Por ello, para cada conjunto de imágenes se recomienda reportar (y, cuando sea posible, mantener constante):

- Voltaje de aceleración (keV)
- Corriente de sonda (si el sistema la reporta)
- Distancia de trabajo (WD)
- Detector (SE/ET, in-column, BSE, etc.)
- Modo de vacío (alto/bajo)
- Magnificación y/o FoV, tamaño de píxel o tamaño de imagen
- Parámetros de barrido (velocidad, promediado/integración de frames)

En la figura 18 se presenta un ejemplo de imágenes SEM en bruto, junto con la información operativa registrada automáticamente durante la adquisición (p. ej., magnificación, energía del haz, modo/detector, distancia de trabajo y barra de escala). Esta información es esencial para asegurar la trazabilidad y la comparabilidad entre imágenes, y permite interpretar con rigor la morfología observada —como el tamaño y la distribución de islas, la coalescencia y la continuidad— bajo condiciones instrumentales claramente definidas [62].

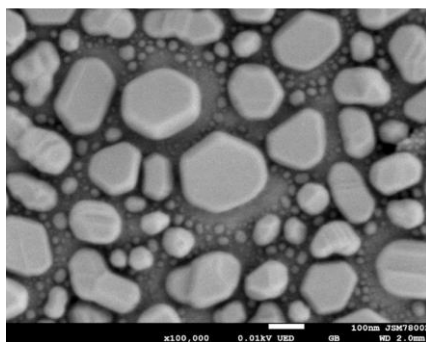


Figura 18. Ejemplo de imagen SEM en bruto y de la información operativa registrada durante la adquisición. (Imagen tomada de [11]).

El EDS se utiliza para confirmar la presencia de elementos (Ag/Au y del sustrato) y evaluar la distribución espacial mediante mapeo. Es importante dejar explícito en este trabajo de investigación que, para películas delgadas sobre sustratos, la cuantificación por EDS suele ser

semicuantitativa, ya que el volumen de interacción puede incluir simultáneamente la película y el sustrato; en consecuencia, las fracciones en masa dependen fuertemente de la energía de los electrones, la geometría, el ángulo de toma, el tiempo de conteo y las correcciones del método [62].

4.5 Difracción de rayos X (DRX/XRD)

Los rayos X son radiación electromagnética de alta energía, con longitudes de onda del orden de los Angstrom. En difracción de rayos X (XRD) se emplean longitudes de onda comparables a las distancias interatómicas, lo que hace de esta técnica una herramienta adecuada para estudiar el ordenamiento cristalino y la estructura de la materia a escala atómica. La aparición de máximos de difracción se describe mediante la ley de Bragg, la cual nos dice que la dispersión de todos los puntos de red de un plano cristalográfico debe estar en fase para poder satisfacer las condiciones de Laue, pero a su vez la diferencia de caminos entre dos planos sucesivos debe de ser un múltiplo entero de las longitudes de onda (ver figura 19-a) [63], es decir

$$n\lambda = 2d\sin\theta. \quad (2)$$

Donde λ es la longitud de onda, d la distancia interplanar, θ el ángulo de Bragg y n un entero positivo.

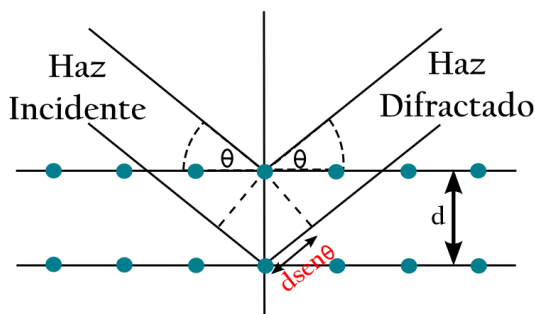


Figura 19. (a) Esquema de difracción de dos ondas de rayos X al incidir sobre dos planos atómicos. (b) Fotografía del difractómetro de rayos X Bruker D8 DISCOVER.

Para el análisis de capas delgadas y regiones cercanas a la superficie se utilizó Difracción de Rayos X en Incidencia Rasante (*Grazing Incidence X-ray Diffraction, GI-XDR*), en la cual el haz incide con un ángulo pequeño ω respecto a la superficie, reduciendo la profundidad efectiva de penetración y favoreciendo la contribución de la película frente a la del sustrato [64]. En una configuración habitual se fija ω y se barre 2θ para registrar el patrón dominado por la película [65].

Las mediciones DRX se realizaron en un difractómetro Bruker D8 DISCOVER (fabricado por Bruker AXS, Alemania, ver figura 19-b), configurado para la caracterización de películas delgadas. Este equipo funciona con un tubo de Cu (radiación Cu $K\alpha$), con longitud de onda $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, operando el generador a 40 kV y 40 mA. La adquisición se realizó en modo de barrido en 2θ con detector PSD en configuración rápida/continua, fijando $\omega \approx 0.4^\circ$ (GI-XRD) y empleando un rango angular de 2θ desde 10° hasta aproximadamente 60° ; se utilizaron dos condiciones de muestreo:

una configuración estándar con $\Delta(2\theta) = 0.00148049^\circ$ y rendija de divergencia 10.5 (según la configuración del equipo), y una configuración de mayor muestreo angular con $\Delta(2\theta) = 0.000740244^\circ$ y rendija de divergencia 0.2.

4.6 Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis)

La espectroscopia UV-Vis se utilizó para caracterizar la respuesta óptica de las películas delgadas (Ag/Au) depositadas sobre sustrato, a partir de espectros en función de la longitud de onda en el rango UV-visible. En este trabajo, debido a que no se midió la transmitancia, se trabajó en modo de reflectancia con esfera integradora, lo que permite recolectar de manera eficiente la radiación reflejada (difusa y especular según la configuración) y mejorar la reproducibilidad en sólidos y superficies dispersivas [41].

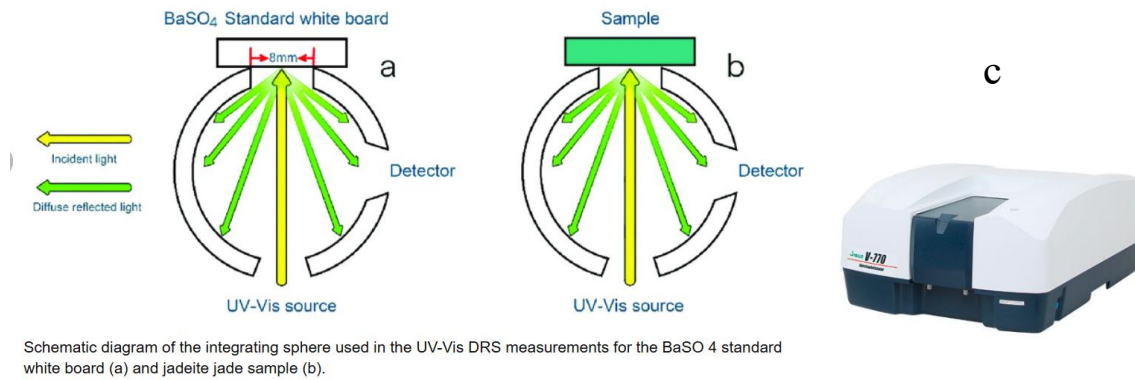


Figura 20. Diagrama esquemático de la medición UV-Vis por **reflectancia** con **esfera integradora**: (a) medición del estándar blanco (BaSO₄) para obtener $I_{\text{ref}}(\lambda)$; (b) medición de la muestra para obtener $I_{\text{muestra}}(\lambda)$. [66]. (c) *Espectrofotómetro UV-Vis-NIR JASCO V-770 utilizado en el CENM (Universidad del Valle, Cali).*

Un espectrofotómetro UV-Vis ilumina la muestra con radiación monocromática (λ) y registra la señal detectada. En reflectancia, el equipo evalúa la razón entre la intensidad reflejada por la muestra y la de un estándar de referencia, es decir $R = I/I_R$. Cuando el material es dispersivo u opaco, una esfera integradora promedia la luz reflejada en múltiples direcciones y la dirige al detector, por lo que es especialmente útil en películas o sustratos donde la reflexión no es puramente especular [67]. La esfera integradora es una cavidad recubierta internamente con un material altamente reflectante y difusor. Su función es “mezclar” (integrar) la luz que entra y la que se refleja en la muestra mediante múltiples reflexiones internas, de modo que el detector reciba una señal que representa el total de luz reflejada que se logra captar en esa geometría (ver figura 20-a) [68].

Como no se midió la transmitancia, la “absorbancia” reportada debe interpretarse como absorbancia aparente (relativa) calculada a partir de la reflectancia. Una forma estándar de expresar esta conversión es la pseudo-absorbancia:

$$A_R(\lambda) = \log_{10} \left(\frac{1}{R(\lambda)} \right). \quad (3)$$

Que es comúnmente reportada como “Abs” en mediciones de reflectancia difusa.

Las mediciones UV–Vis se realizaron en el Centro de Excelencia de Nuevos Materiales (CENM, Universidad del Valle, Cali) usando un espectrofotómetro JASCO V-770 equipado con el accesorio de esfera integradora ISN-923 (ver figura 20-c), configurado en modo fotométrico %R (reflectancia) [67].

Previo a las mediciones, el sistema se referenció usando un estándar difuso de alta reflectancia tipo Spectralon®, comúnmente empleado para calibrar la reflectancia por su comportamiento altamente lambertiano y por contar con calibraciones trazables (p. ej., a NIST, según el proveedor/certificado del estándar)[69].

Las medidas se adquirieron con los siguientes parámetros:

- Rango espectral: 300–900 nm (el barrido se almacenó de 900→300 nm).
- Paso espectral (intervalo de datos): 2 nm (301 puntos).
- SBW : 5.0 nm (UV/Vis) y 20.0 nm (NIR).
- Modo de escaneo: continuo; velocidad de escaneo: 400 nm/min.
- Response: 0.06 s.
- Fuentes: D2/WI con cambio automático a 340 nm; cambio de red a 850 nm.
- Corrección: línea base; 1 ciclo.

4.7 Espectroscopía Raman.

La espectroscopia Raman se basa en la dispersión inelástica de la luz: una fracción pequeña de los fotones incidentes intercambia energía con las vibraciones moleculares, generando bandas en el espectro a desplazamientos característicos (cm^{-1}). Esto permite identificar las moléculas y su entorno químico (figura 21-a).

En la configuración microscópica/confocal (micro-Raman), la combinación de microscopio y espectrómetro permite medir regiones micrométricas y mapear heterogeneidades.

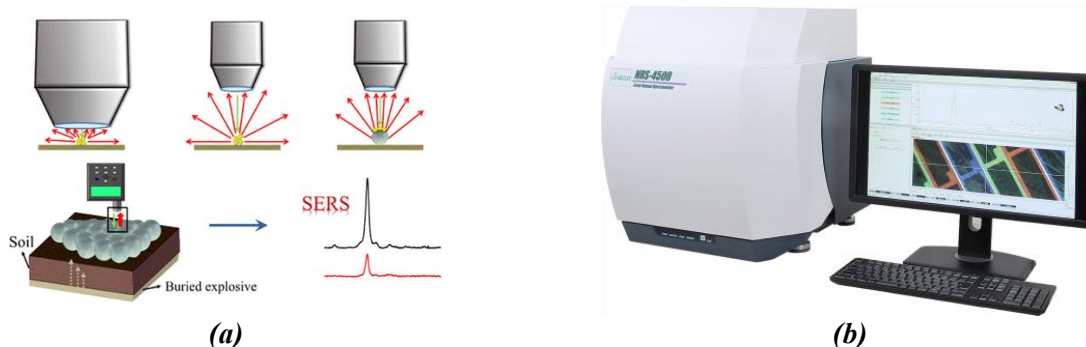


Figura 21. (a). Esquema conceptual de medición micro-Raman en superficies SERS (comparación Raman vs. SERS) y control de variables instrumentales. (Figura tomada de la Ref. [70]). **(b).** Fotografía del microscopio Raman confocal JASCO NRS-4500 utilizado en el CENM (Universidad del Valle, Cali).

Las mediciones Raman se realizaron en un microscopio Raman confocal JASCO NRS-4500 (en tu material aparece como RMS 4500; en los catálogos suele figurar como NRS-4500), que integra un espectrógrafo y un microscopio, con selección automatizada de láser, redes y filtros.

Para asegurar la comparabilidad entre condiciones, se fijaron los parámetros ópticos principales (láser, red, rendijas, objetivo y filtros) y se controló la potencia en la muestra. Los parámetros de configuración base, son los siguientes:

- Longitud de onda del láser: 457.1 nm.
- Monocromador: single.
- Red (grating): 1200 líneas/mm (en tu tabla aparece como L1200/BL500nm).
- Rendija (slit): $200 \times 8000 \mu\text{m}$.
- Objetivo: 100 $\times$ (MPLN 100 $\times$).
- División óptica (BS/DM): 30/70.
- Reducción de rayos cósmicos: ON.
- Potencia del láser (en muestra): ajustada a 0.3 mW mediante un atenuador, fijando la potencia al 5%.

Una vez que se tiene la configuración en el equipo, se seleccionó la región de interés sobre la superficie y se enfocó con un objetivo de 100 $\times$ para maximizar el acoplamiento óptico y la recolección de señal. Luego se fijó el láser en 457.1 nm, con una red de 1200 líneas/mm y una rendija de $200 \times 8000 \mu\text{m}$. Para evitar la saturación, el calentamiento local o la fotodegradación, la potencia se ajustó mediante atenuación (0.3 mW en la muestra). De esta forma, se adquirieron espectros activando la opción de reducción de rayos cósmicos y se guardaron para realizar comparaciones estrictas entre condiciones (p.ej., antes/después de la interacción con Hg); adicionalmente, se debe medir en las mismas coordenadas x–y–z del sustrato, siempre que sea posible, para tener control espacial.

4.8 Metodología *turn-off* señal SERS

En SERS, el *EF* proviene principalmente del campo electromagnético localizado generado por plasmones en nanoestructuras metálicas (Ag/Au) o a lo largo de la interfaz dieléctrico, además de posibles contribuciones químicas, lo que hace que moléculas cercanas a la superficie metálica produzcan señales Raman intensificadas [71].

En sensores SERS tipo *turn-off*, la presencia del analito (en este caso, Hg^{2+}) reduce la señal SERS del reportero o de la molécula de marcación seleccionada, en este caso, rodamina B (RhB). En sistemas basados en plata, esto suele asociarse a: (i) la interacción Hg–Ag (incluida la formación de amalgamas bajo ciertas condiciones), (ii) cambios en la respuesta plasmónica que disminuyen el EF, y/o (iii) el desplazamiento o la competencia de adsorción del reportero en la superficie [50].

4.8.1 Reactivos y preparación de soluciones

Solución de RhB a 5ppm

Se preparó una solución madre de 50 ppm disolviendo 1.25 mg en un matraz aforado de 25 mL, con sonificación durante 5 min para asegurar la disolución completa. A partir de esa solución

madre se prepararon estándares de 3 ppm y 5 ppm (1.5 mL y 2.5 mL de madre, respectivamente, aforados a 10 mL), con sonicación durante 5 min y protección de la luz, para evitar la fotodegradación de la RhB (se almacenan en frascos ámbar y bajo refrigeración a $\sim 20^\circ\text{C}$)

Soluciones stock y estándares de Hg^{2+}

Los estándares E_i (E1–E5) de Hg^{2+} se obtuvieron por diluciones seriadas a partir de soluciones stock preparadas con concentración conocida: primero se preparó S1 (10 mM) disolviendo HgCl_2 y acidificando con 1,0 mL de HNO_3 en un matraz aforado de 100 mL; luego se preparó S2 (100 μM) tomando 1,0 mL de S1 y aforando a 100 mL, añadiendo 0,50 mL de HCl al 1%; y después S3 (2 μM) tomando 1,00 mL de S2 y aforando a 50 mL con 0,20 mL de HCl al 1%, para mantener el medio ácido y estable. Con estas soluciones stock, se prepararon los estándares finales en matraces aforados de 10 mL (pH 2–3) aplicando la relación $C_1V_1 = C_2V_2$: se añadió el volumen de stock correspondiente (E1: 0,025 mL de S3 $\rightarrow$ 5 nM; E2: 0,050 mL de S3 $\rightarrow$ 10 nM; E3: 0,50 mL de S3 $\rightarrow$ 100 nM; E4: 0,10 mL de S2 $\rightarrow$ 1000 nM; E5: 1,00 mL de S2 $\rightarrow$ 10 000 nM), se agregó a cada matraz 0,10 mL de HCl al 1%, y finalmente se completó con agua ultrapura hasta la marca de 10 mL y se homogenizó mediante sonicación durante 5 min.

Preparación de la muestra y ejecución del ensayo *turn-off*

Para cada sistema sin tratamiento térmico (S1–S3) se realizaron pruebas, iniciales para evaluar cual debería ser el volumen ideal de depósito para la gota de RhB de 5 ppm de 2–5 μL (En la Figura 22-a la cantidad de puntos hace referencia al volumen de secado de la gota en μL), cada plataforma y se dejó secar bajo una condición controlada de humedad relativa, mediante disposición de paños húmedos en la base de la caja, usando siempre la misma proporción de agua y papel (ver figura 22-b), almacenado en todos los casos en una caja recubierta con papel aluminio, para aislar la luz de las muestras, protegiendo de polvo y fotodegradación de la rodamina por interacción con la luz (ver figura 22-c). Se evaluó y se determinó que la gota con la mejor relación entre área y borde de la mancha para identificar el efecto de depósito por evaporación (*coffee-ring*) es de 2 μL .

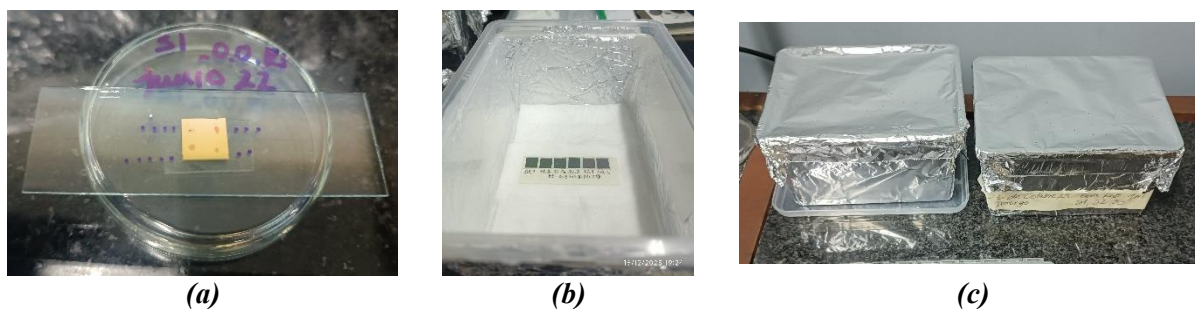


Figura 22. Depósito de la gota a diferentes volúmenes (a), control de la humedad mediante papel húmedo en la base (b) y almacenamiento con embalaje en papel de aluminio (c).

Para reducir la variabilidad que pueda presentar la señal SERS, el sustrato debe fijarse al portamuestras (figura 23-b) y deben registrarse las coordenadas de referencia (x,y,z) de la intensidad de la señal SERS (I_0), para volver al mismo punto después de añadir Hg^{2+} . Este proceso se realizó de forma ordenada para cada plataforma, de acuerdo con la indexación de la secuencia de gotas, como se observa en la figura 23-a. Para cada medida, se realizaron dos réplicas de la plataforma con el propósito de identificar patrones o convergencias en la señal SERS.

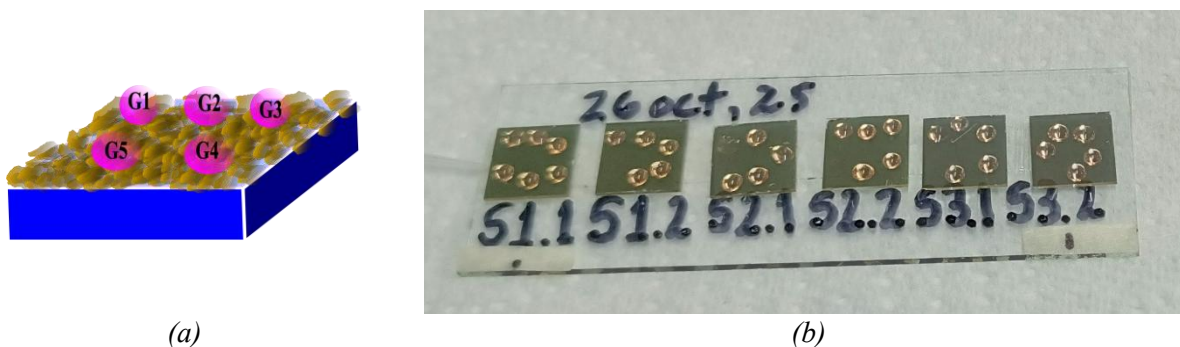


Figura 23. (a) Muestra el ordenamiento secuencial de los depósitos de las gotas (G1-G5), (b) así como el sustrato sobre el cual se fijan las muestras S1-S2 y sus respectivas réplicas.

Sobre la misma huella de RhB, se añadió una gota pequeña de solución de Hg^{2+} de 2 μL a la concentración correspondiente al rango de 5–10000 nM (E1–E5); se dejó secar y se midió nuevamente en el mismo punto (x,y, z) para obtener I (después de Hg^{2+}). Para RhB, es común reportar bandas intensas y relativamente robustas en $\sim 1356\text{--}1360\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$, asociadas a vibraciones del anillo (C--C/C=C) [72].

En nuestro caso, la métrica se construye a partir de las bandas a $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ (pico 1 de referencia) y a $\sim 1643\text{ cm}^{-1}$ (pico 2 de referencia) [72].

Para el análisis de la respuesta SERS, los archivos que arroja el equipo son procesados, siguiendo la ruta de proceso:

- Corrección de la línea base (para mitigar la fluorescencia y el fondo).
- Suavizado leve solo si no deforma los picos (documentar si se usa).
- Normalización del tiempo de integración si cambia (idealmente, mantenerlo constante).

Métrica cualitativa ratiométrica (cociente de intensidades)

En lugar de ajustar una curva intensidad–concentración (cuantitativa), se usó un índice ratiométrico basado en dos bandas de RhB para capturar el cambio espectral de forma más robusta ante variaciones locales de EF:

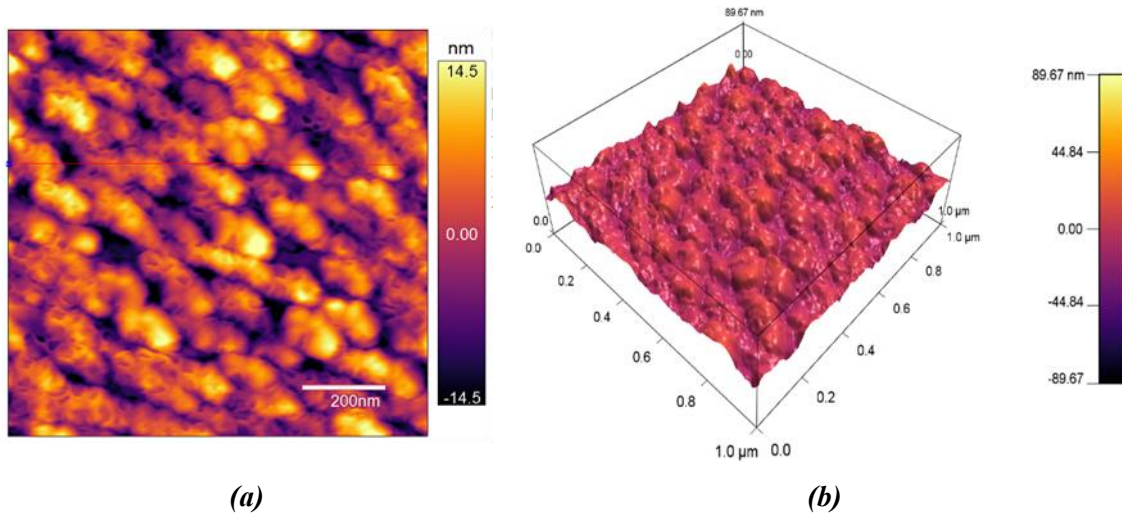
$$R = \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

Donde I e I_0 son intensidades (altura o área) en los picos ~ 1350 y $\sim 1643\text{ cm}^{-1}$.

5 Resultados

5.1 Caracterización Topográfica (AFM)

Se empleó la microscopía de fuerza atómica (AFM) para evaluar la topografía superficial a escala nanométrica de los sistemas S1, S2 y S3 en su estado inicial (sin tratamiento térmico, *as-deposited*). Este análisis permite caracterizar la superficie de las películas mediante el tamaño de grano o dominio (D) y la rugosidad cuadrática media (Ra), parámetros clave para identificar la morfología de las películas previa a la aplicación de los tratamientos térmicos. En la figura 24 se presentan las imágenes de AFM correspondientes a los tres sistemas bimetálicos. En particular, las imágenes (a) y (b) muestran la topografía del sistema S1, a partir de las cuales se estimaron una rugosidad media aritmética de $Ra = 5.02 \pm 0.05$ nm y un tamaño de grano de $D = 65 \pm 2$ nm. En contraste, el sistema S2 presenta una rugosidad menor, $Ra = 2.50 \pm 0.05$ nm, y un tamaño de grano intermedio, $D = 54 \pm 2$ nm. Finalmente, para el sistema S3, las imágenes (e) y (f) permitieron estimar una rugosidad aún más baja, $Ra = 1.80 \pm 0.05$ nm, junto con un tamaño de grano promedio de $D = 33 \pm 2$ nm.



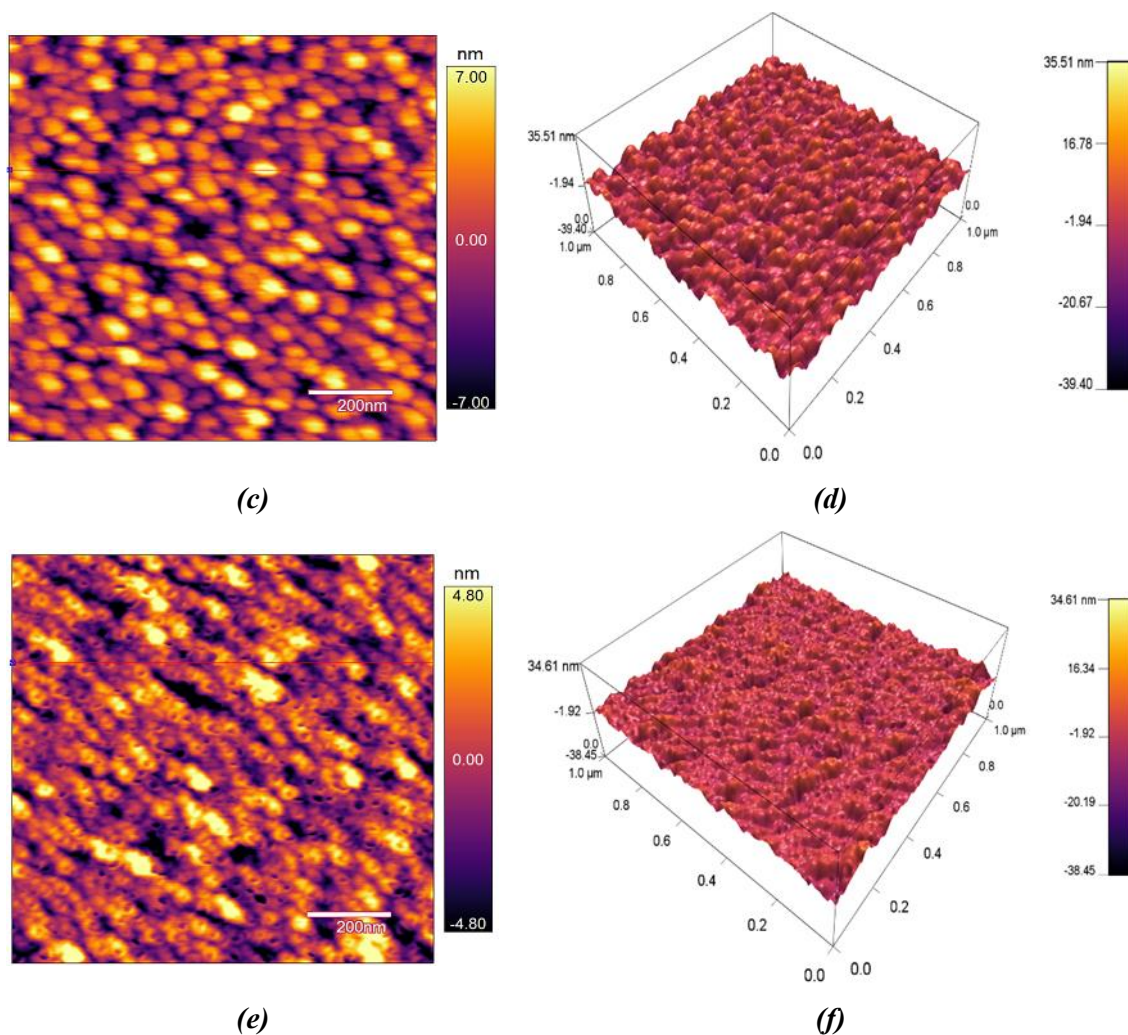


Figura 24. Topografía por AFM de los sistemas S1-S3 depositados sobre BSG. (a), (c) y (e) son los mapas 2D de la altura (región de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$); (b), (d) y (f) son las reconstrucciones 3D de la misma región.

Los valores cuantitativos de rugosidad y tamaño de grano para cada sistema se resumen en la tabla 2.

Sistema <i>as-deposited</i>	S1_0.0	S2_0.0	S3_0.0
$Ra \pm 0.05\ (\text{nm})$	5.02	2.50	1.80
$D \pm 2\ (\text{nm})$	65	54	33

Tabla 2. Rugosidad media (Ra) y tamaño de grano (D) estimados a partir del análisis AFM de los sistemas S1–S3 en estado *as-deposited*.

La tendencia observada, en la que la rugosidad superficial disminuye a medida que aumenta el contenido de Ag en el sistema y se reduce la fracción de Au, manteniendo constante el espesor total de cada sistema en 30 nm, constituye un aspecto fundamental para comprender la evolución

morfológica de las películas. Este comportamiento define el grado de nanoestructuración alcanzado en cada sistema y su relación con el espesor relativo de las capas de cada metal. Adicionalmente, se observa un incremento del tamaño de grano promedio en función del espesor de la capa de oro. En la figura 25 se presenta la tendencia de ambos parámetros en función del espesor relativo entre las capas de oro y de plata.

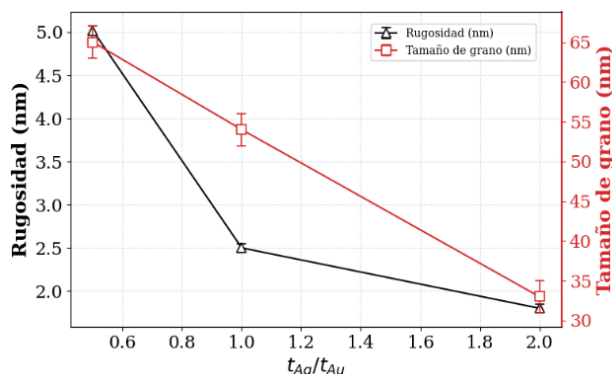


Figura 25. Representación de la tendencia entre la rugosidad y el tamaño de grano, a medida que varía la fracción Ag:Au en los sistemas S1 (1:2), S2 (1:1) y S3 (2:1).

Las topografías obtenidas de los tres sistemas indican que las muestras “*as-deposited*” pueden utilizarse como plataformas para evaluar el efecto SERS.

5.2 Caracterización Morfológica (SEM) y Composicional (EDS)

5.2.1 SEM de las plataformas S1-3 *as-deposited* y con tratamiento térmico de 3.0 horas

En la figura 26, se presentan las imágenes SEM de los sistemas S1-S3 (sin tratamiento térmico y con tratamiento de 3.0 h, respectivamente) a dos magnificaciones diferentes. En el caso de las muestras sin tratamiento térmico, vemos cómo las bicapas crecieron con una morfología granular compacta, y con la presencia de algunos pocos agujeros (contrastes más oscuros) aleatoriamente distribuidos, de formas irregulares y con tamaños de unos pocos cientos de nanómetros. Este tipo de morfología es consistente con los resultados obtenidos mediante AFM. Sin embargo, al realizar un tratamiento térmico durante 3 h, se observa un incremento en el número y el tamaño de los agujeros, que aumenta a medida que la fracción Ag:Au aumenta, a la vez que la superficie de las bicapas evoluciona hacia una microestructura con mayor densidad de bordes y separaciones entre dominios, formando una especie de membrana en el caso del sistema S3. En SSD, esta transición depende fuertemente de: (i) el espesor total, (ii) las energías superficiales e de interfaz entre el metal y el sustrato y (iii) la cinética de difusión. Por eso, es razonable que S1–S3, al presentar

proporciones distintas de Ag/Au, presenten tasas y mecanismos de coalescencia de fragmentación diferentes, aunque el mecanismo global sea el mismo [65].

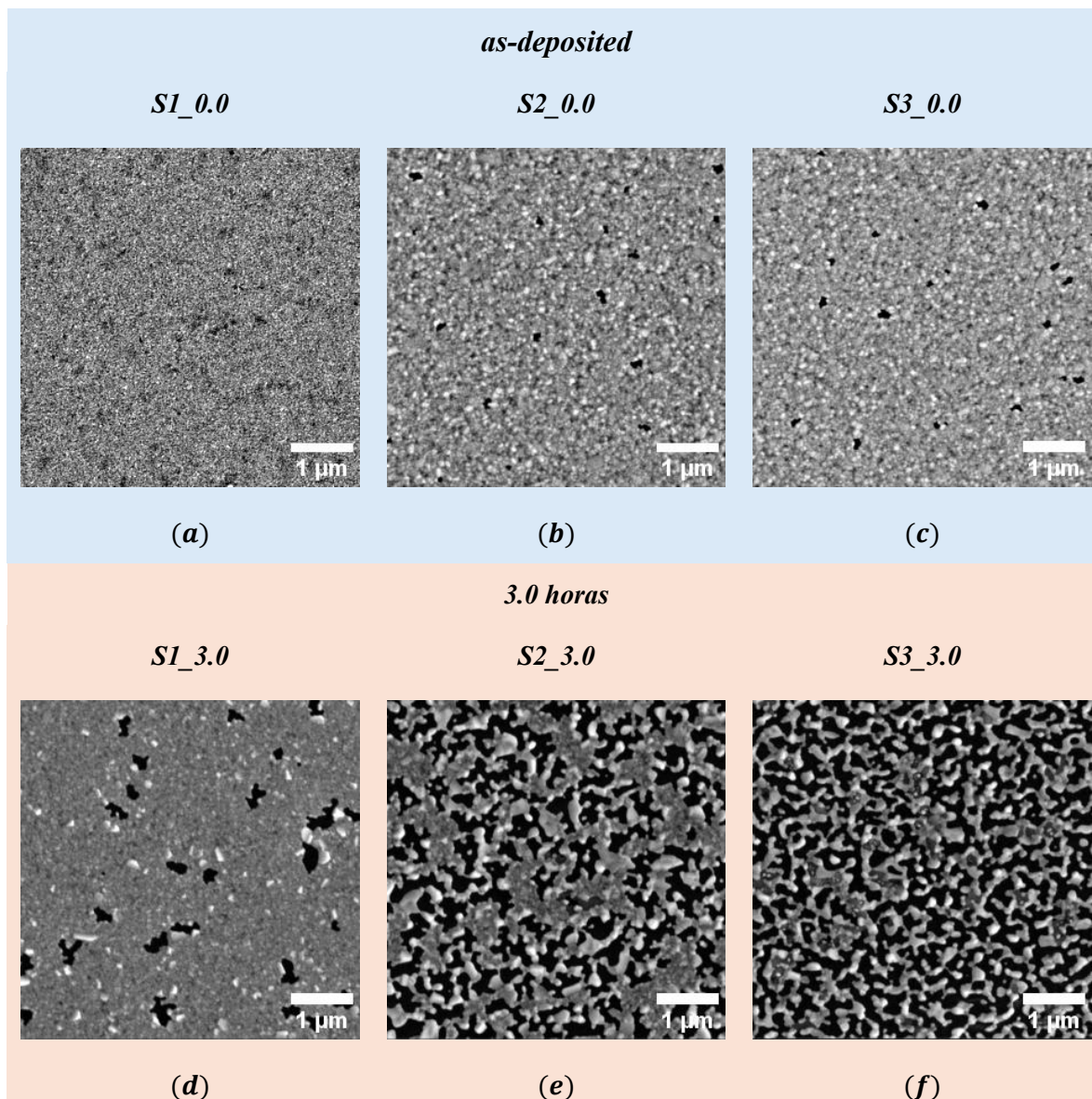


Figura 26. Imágenes SEM a una magnificación de 30000x de los sistemas S1, S2 y S3 : (a–c) sin tratamiento térmico; (d–f) con tratamiento térmico de 3 h.

5.2.2 SEM de las plataformas S1-3 con tratamiento térmico de 0.5 y 1.0 horas

En la figura 27 se presentan imágenes SEM a diferentes magnificaciones, tomadas de muestras en las que se realizaron procesos de fragmentación térmica a tiempos más cortos (0.5 h y 1 h), con el propósito de analizar la evolución del proceso de fragmentación térmica, alcanzada al llegar a la microestructura observada en las muestras tratadas a 3 h. Una característica que no se logró observar en el proceso de fragmentación térmica a 3 h, es la formación de nanoislas “puntuales” (nanoestructuras cuasi-esféricas de unos cuantos nanómetros de tamaño) dentro de los agujeros, especialmente en los sistemas S2 y S3. Teniendo en cuenta la morfología de estas nanoislas, similares a las reportadas en [48], [73], se puede afirmar que son plataformas potencialmente aprovechables, para evaluar la actividad SERS.

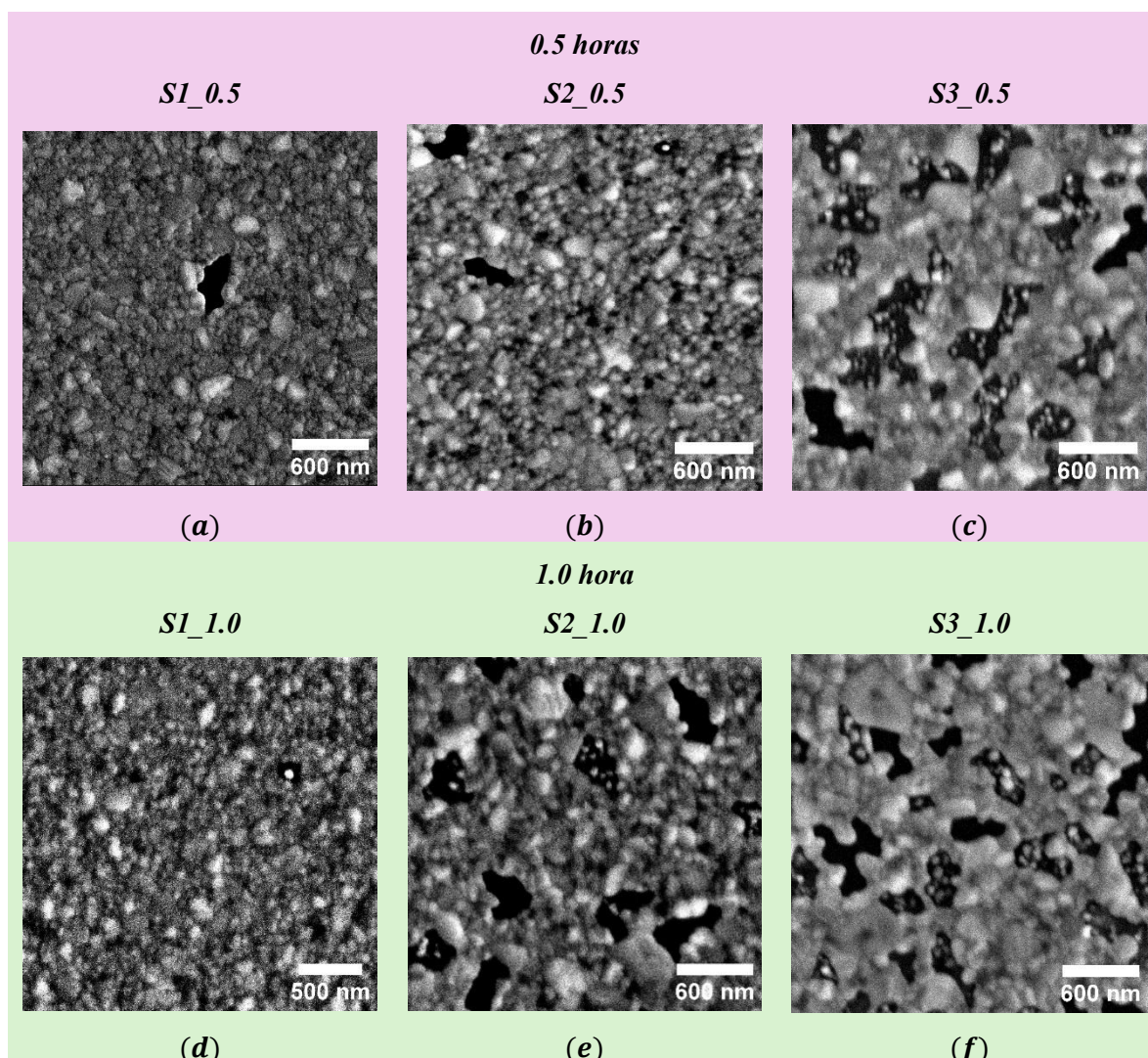


Figura 27. Imágenes SEM a una magnificación de 150000x de los sistemas S1, S2 y S3: (a–c) tratamiento térmico durante 0.5 horas y (d–f) durante 1 hora.

5.2.3 EDS de sistemas S1-S3 *as-deposited* y 3.0 horas de tratamiento térmico

El EDS se realizó en los sistemas S1-S3; se adquirió a 30 *kx* de magnificación y, con el objetivo de evitar la contribución del volumen de interacción del sustrato de borosilicato (Si, O, Na, Al), no se reportan los %*p/p* absolutos, como si fueran la composición real de la película, puesto que pueden inducir errores. En cambio, se emplea la proporción Ag:Au para hacer comparables los valores experimentales y los valores teóricos esperados para películas delgadas sobre sustratos masivos [74].

A continuación, se registran los porcentajes de masa (% *p/p*) de Ag y Au dentro del recubrimiento; para su cálculo, se asumió que cada capa metálica es uniforme y cubre un área de 1 cm², según la configuración del sistema, de acuerdo con lo discutido en la sección 4.1 del método experimental (tabla 3).

<i>Sistema</i>	<i>Tratamiento térmico</i>	<i>Ag_Teo</i> (% <i>p/p</i>)	<i>Au_Teo</i> (% <i>p/p</i>)
<i>S1_0.0</i>	<i>as-deposited</i>	21.4	78.7
<i>S2_0.0</i>	<i>as-deposited</i>	35.2	64.8
<i>S3_0.0</i>	<i>as-deposited</i>	52.1	47.9

Tabla 3. %*p/p* teóricos de Ag y Au para los sistemas S1-S3 sin tratamiento (*as-deposited*).

Se procede a hacer el compendio de los valores de %*p/p* experimentales obtenidos a partir de los valores obtenidos mediante EDS para los sistemas S1-S3 *as-deposited* y con tratamiento térmico de 3.0 horas (tabla 4).

<i>Sistema</i>	<i>Tratamiento térmico</i>	<i>Ag</i> (% <i>p/p</i>)_Exp	<i>Au</i> (% <i>p/p</i>)_Exp	% <i>e</i> Ag	% <i>e</i> Au
<i>S1</i>	<i>as-deposited</i>	20.9	79.1	2.3	0.5
<i>S2</i>	<i>as-deposited</i>	34.3	65.8	2.6	1.5
<i>S1</i>	3.0 horas	19.7	80.2	7.9	1.9
<i>S2</i>	3.0 horas	32.3	67.7	8.2	4.5
<i>S3</i>	3.0 horas	49.5	50.5	5.0	5.4

Tabla 4. %*p/p* experimentales de Ag y Au de los sistemas S1-S3 sin tratamiento (*as-deposited*) y con tratamiento térmico de 3.0 horas.

En las tablas 3 y 4 se refleja que, al comparar el %*p/p* teórico con el experimental sin tratamiento térmico, este permanece prácticamente constante, con un error porcentual máximo de desviación del valor esperado de 2.6 % para Ag y 1.5 % para Au en el sistema S2. Análogamente, tras un tratamiento térmico de 3 horas, el %*p/p* se mantiene aproximadamente constante, con un error porcentual máximo de desviación respecto del valor esperado de 8.2 % para Ag y 4.5 % para Au

en el sistema S2; en ambos casos extremos de desviación, este no supera el 10 % de error; en consecuencia, dicho tratamiento no afecta la composición de los sistemas, sino que solo modula su morfología. Lo que implica que el tratamiento térmico no afecta la composición de los sistemas, sino que solo modula su morfología.

5.3 Caracterización Óptica (UV–Vis)

Empleando la espectroscopía óptica, se evaluaron la absorción y reflexión, en los rangos UV-VIS-NIR, de los sistemas S1, S2 y S3 en su estado inicial (sin tratamiento térmico, *as-deposited*), y con tratamiento térmico de 0.5, 3.0 y 6.0 horas. Este análisis permite caracterizar la respuesta de los plasmones.

En la figura 28 se presentan las absorbancias normalizadas de los sistemas S1, S2 y S3 sin tratamiento térmico, con luz blanca incidiendo sobre la superficie de oro (figura 28-a) y sobre el sustrato (figura 28-b). En películas metálicas delgadas (y más aún en bicapas), esta comparación es relevante porque la señal registrada en modo “absorbancia aparente” (obtenida a partir de la reflectancia) no depende solo de la composición, sino también de la secuencia de capas, de las interferencias, del camino óptico efectivo que experimenta la luz desde el sustrato hasta alcanzar las capas metálicas, además del modo de adquisición, bien sea por transmitancia o reflectancia (especular o difusa) [75].

Los espectros ópticos mostrados en la figura 28 se corresponden con plasmones ópticos, debidos a las interacciones superficiales (metal-dieléctrico), las formaciones discontinuas granulares, las cuales fueron evidenciadas en las imágenes de microscopía. De los espectros mostrados en la figura 28-a, se evidencian dos situaciones. Primero, la longitud de onda del pico máximo de absorción plasmónica se desplaza debido a la relación de espesores entre el oro y la plata; segundo, el FWHM de los espectros plasmónicos presenta variaciones significativas según la proporción de espesores entre el oro y la plata. En sistemas desordenados o cercanos a la percolación, es normal observar respuestas ópticas cuyo FWHM esté asociado a una distribución de tamaños, acoplamientos locales y *hot spots* estadísticos [75]. Esta característica de los espectros de resonancia plasmónica sugiere un conjunto de resonancias que pueden conducir a la excitación o dispersión Raman, lo cual es favorable para la intensificación electromagnética del fenómeno SERS [28].

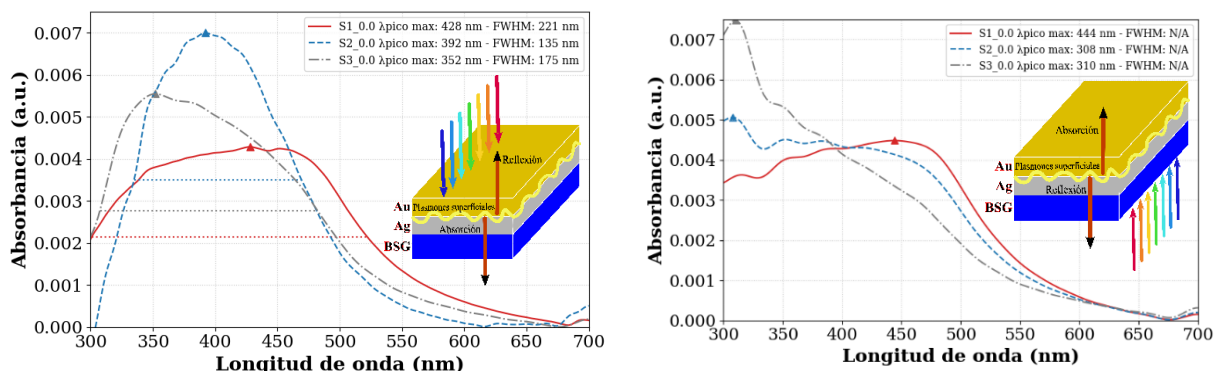


Figura 28. Comportamiento de la respuesta UV-Vis de los sistemas S1, S2 y S3 sin tratamiento térmico, en el orden de incidencia del haz: (a) Au/Ag/BSG y (b) BSG/Ag/Au.

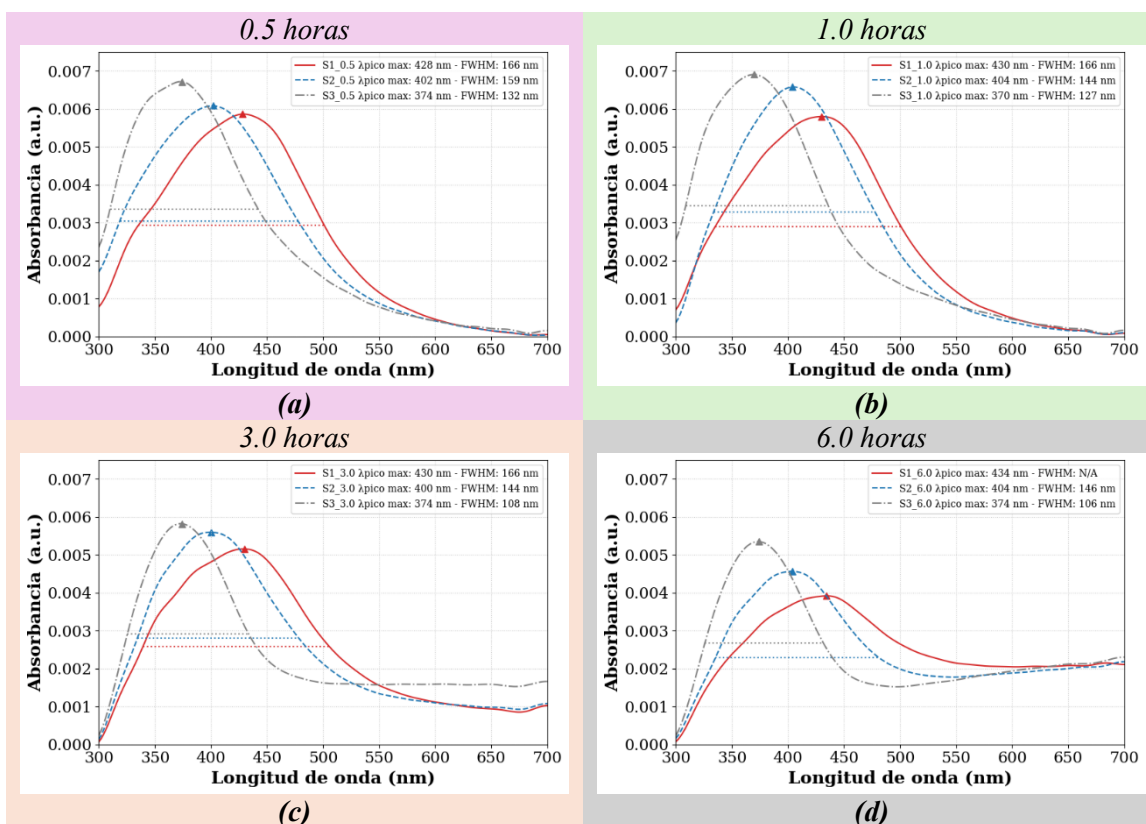


Figura 29. Contraste de la respuesta UV-Vis de los sistemas S1, S2 y S3 tras realizar tratamiento térmico de (a) 0.5 horas; (b) 1.0 hora; (c) 3.0 horas y (d) 6.0 horas

La figura 29. Muestra los espectros de absorción plasmónica de los sistemas S1, S2 y S3 con tratamientos térmicos de 0.5 h (a), 1.0 h (b), 3.0 h (c) y 6.0 h (d). Los tres sistemas no muestran una variación significativa en los picos de máxima intensidad de absorción plasmónica con el aumento del tiempo de tratamiento térmico.

Los resultados se resumen en la tabla 5, donde se registran los valores de la longitud de onda a la que se localiza el pico máximo de cada sistema (S1, S2 y S3) tras aplicar los tratamientos térmicos de 0.5 - 6.0 horas. Asimismo, se indica el *FWHM*.

Recocido (h)	0.5		1.0		3.0		6.0	
Sistema	$\lambda_{max} \pm 2 \text{ (nm)}$	$FWHM \pm 2 \text{ (nm)}$	$\lambda_{max} \pm 2 \text{ (nm)}$	$FWHM \pm 2 \text{ (nm)}$	$\lambda_{max} \pm 2 \text{ (nm)}$	$FWHM \pm 2 \text{ (nm)}$	$\lambda_{max} \pm 2 \text{ (nm)}$	$FWHM \pm 2 \text{ (nm)}$
S1	428	166	430	166	430	166	434	NA
S2	402	159	404	144	400	144	404	146
S3	374	132	370	127	374	108	374	106

Tabla 5. Resumen de los valores de la longitud de onda del pico de absorción máxima (λ_{max}) y del ancho del pico máximo a media altura (*FWHM*).

En la figura 30 se muestran los espectros ópticos de absorción plasmónica de los sistemas S1, S2 y S3 variando el tratamiento térmico. Los espectros muestran que la posición del pico máximo del plasmón es independiente del tiempo de tratamiento térmico. Se evidencia una diferencia máxima de $\pm \Delta \lambda_{max} = 6 \text{ nm}$ entre los sistemas S1, S2 y S3 (valores promedio de 431 nm, 403 nm y 373 nm, respectivamente), en contraste, si se observa un cambio significativo en el *FWHM* para cada sistema posterior al tratamiento térmico, en particular se aprecia como el aumento del tiempo induce coalescencia y percolación de las nano-estructuraciones, lo que aumenta la distancia entre *nanoislas* y por lo tanto la disminución de *nanogaps* y *hot spots*, siendo este un indicador de la baja viabilidad de mejorar la formación de *los mismos* para tratamientos de 6.0 horas.

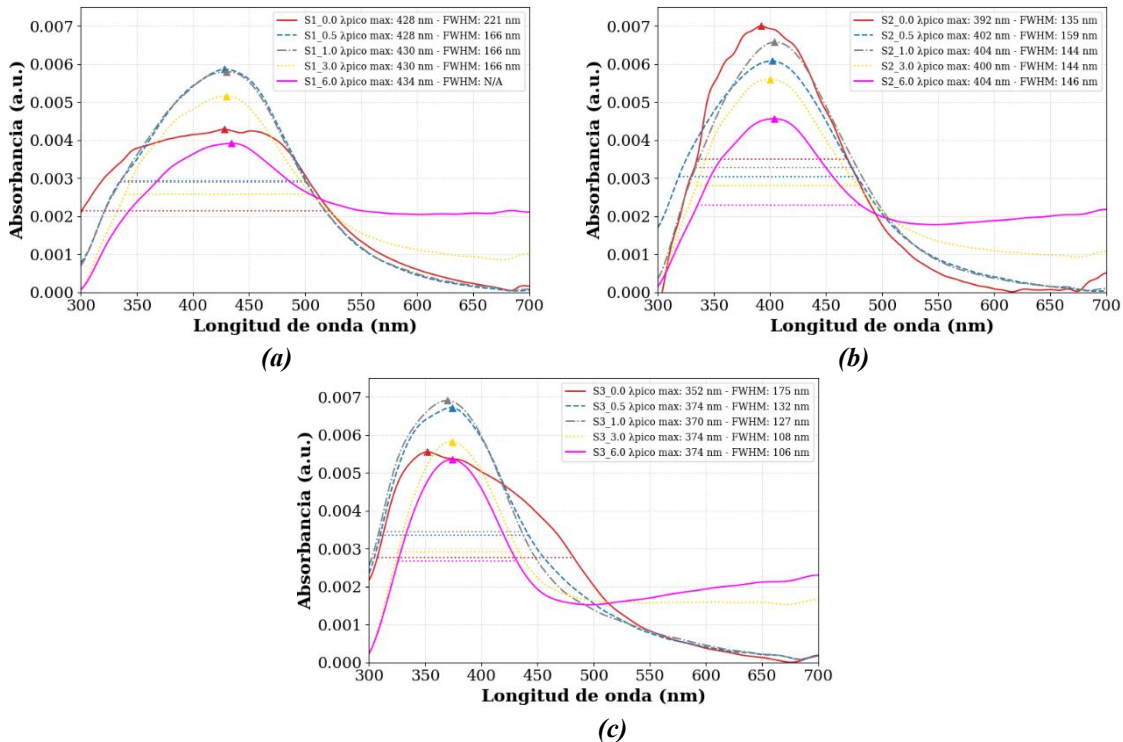


Figura 30. Respuesta óptica UV-VIS para los sistemas sin tratamiento térmico y con tratamiento de 0.5-6.0 horas de forma independiente para cada sistema (a) S1, (b) S2 y (c) S3.

5.4 Caracterización Estructural (Rayos X)

Se empleó la difracción de rayos X para evaluar la evolución estructural de los sistemas S1, S2 y S3 tras tratamientos térmicos de 30 min y 60 min a 300 °C. Este análisis permite identificar las fases cristalinas presentes o las transformaciones inducidas por el tratamiento térmico, así como los cambios en el grado de cristalinidad y en la orientación preferencial. En la figura 31 se observa el difractograma DRX de las plataformas S1, S2 y S3 tras recocer en aire a 300 °C durante 30 min y 60 min. En todos los casos, el patrón está dominado por las reflexiones características de una red fcc (principalmente las familias (111) y (200)), sin aparición de picos adicionales. La ausencia de nuevas reflexiones atribuibles a compuestos intermetálicos u otras fases cristalinas es consistente con el hecho de que la Ag y el Au comparten la misma estructura (fcc) y forman soluciones sólidas continuas de Ag–Au en todo el intervalo composicional; por tanto, en películas delgadas (donde los picos suelen ensancharse y solaparse), es esperable observar principalmente las reflexiones fcc de la aleación sólida monofásica Au–Ag y no señales distinguibles de otras fases ordenadas [76]. Jialin Ji y *et al.*, en su trabajo de investigación, muestran que, aun comparando películas *as-deposited* (Au, Ag y Au/Ag) con variantes de tratamiento térmico, se mantienen las mismas reflexiones fcc y el efecto principal del tratamiento térmico es modificar la intensidad y la anchura de los picos, más que generar fases nuevas [77].

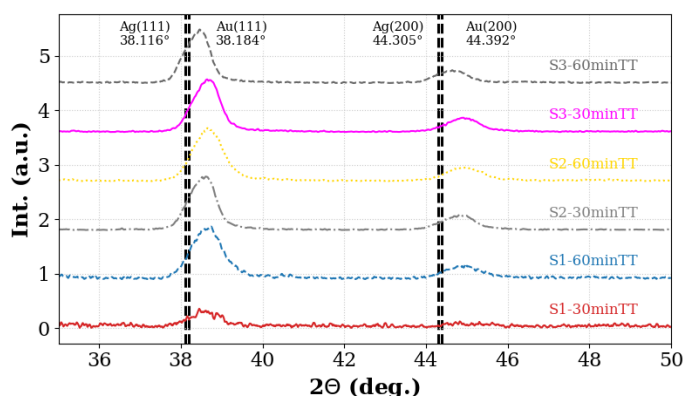


Figura 31. Comparación de los patrones de difracción de rayos X (DRX/XRD) de bicapas Ag/Au sometidas a tratamiento térmico. (a) Difractogramas de las plataformas SERS S1, S2 y S3, tras tratamiento térmico en aire a 300 °C durante 0.5 h y 1.0 h.

Respecto a las diferencias entre 30 min y 60 min en los tres sistemas (ver figura 31), el DRX sugiere que la variable dominante no es un “cambio de fase”, sino cambios sutiles asociados a la evolución microestructural (p. ej., variación de textura, tamaño de cristalito o de dominios coherentes y relajación de defectos) y, sobre todo, a la cinética del SSD. En películas metálicas delgadas, el tratamiento térmico promueve la reducción de la energía superficial e interfacial y puede transformar películas continuas en nanoestructuras sin necesidad de que aparezcan nuevas fases cristalinas, por lo que DRX se interpreta como la misma red fcc, mientras que la morfología cambia drásticamente [26]. Esta idea es coherente con reportes en los que la aleación Au–Ag puede formarse durante o después del proceso de tratamiento térmico por difusión sólida, y el “orden de

proceso” afecta principalmente la morfología final (aleación vs. *core-shell*, distribución de tamaños y separación interpartícula patrón), es decir, variables críticas para la respuesta plasmónica y SERS, más que para el DRX [77].

En todos los casos se observan únicamente reflexiones compatibles con una estructura fcc, destacando las contribuciones cercanas a (111) ($\sim 38\text{--}39^\circ$) y (200) ($\sim 44\text{--}45^\circ$). De acuerdo con las tarjetas estándar del *Powder Diffraction File (PDF)* del *International Centre for Diffraction Data (ICDD)* (radiación Cu K α), los valores de referencia para los metales puros fcc son: Ag(111) = 38.116° y Au(111) = 38.184° ; y para (200), Ag(200) = 44.305° y Au(200) = 44.392° [78]. Aunque las diferencias en 2θ son pequeñas ($\approx 0.07\text{--}0.09^\circ$), resultan relevantes en películas delgadas y sistemas bimetalicos, ya que el ensanchamiento de los picos puede producir solapamiento aparente; por ello, las posiciones experimentales se discuten siempre con respecto a estos valores estándar [79]. En nuestros difractogramas, las posiciones se sitúan entre las de Au y Ag puros, lo cual es consistente con la formación de una solución sólida fcc Au–Ag; no se detectan picos adicionales atribuibles a óxidos o compuestos intermetálicos. En consecuencia, se puede afirmar que el orden de depósito tiende a afectar más la cinética del proceso de SSD y la morfología que la fase cristalina observada por DRX.

5.1 Caracterización de Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman se empleó para evaluar la actividad plasmónica de las plataformas desarrolladas y su respuesta frente a iones de mercurio inorgánico (Hg^{2+}) en medio acuoso. Como referencia espectral, se obtuvo inicialmente el espectro Raman de rodamina B (RhB) en estado sólido (polvo), identificándose dos bandas características intensas y reproducibles centradas en $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$ (figura 32). Estas regiones, sensibles a modificaciones del entorno superficial y ampliamente utilizadas en estudios SERS, fueron seleccionadas como ventanas de análisis: *Pico 1* ($1300\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$) y *Pico 2* ($1630\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$) [80]. La inclusión de ambas bandas permite una verificación cruzada de la consistencia espectral ante perturbaciones externas.

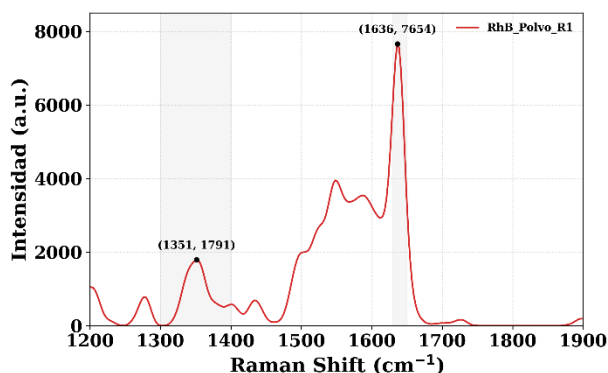


Figura 32. Espectro Raman de referencia de rodamina B (RhB) en polvo, empleado para identificar bandas de referencia.

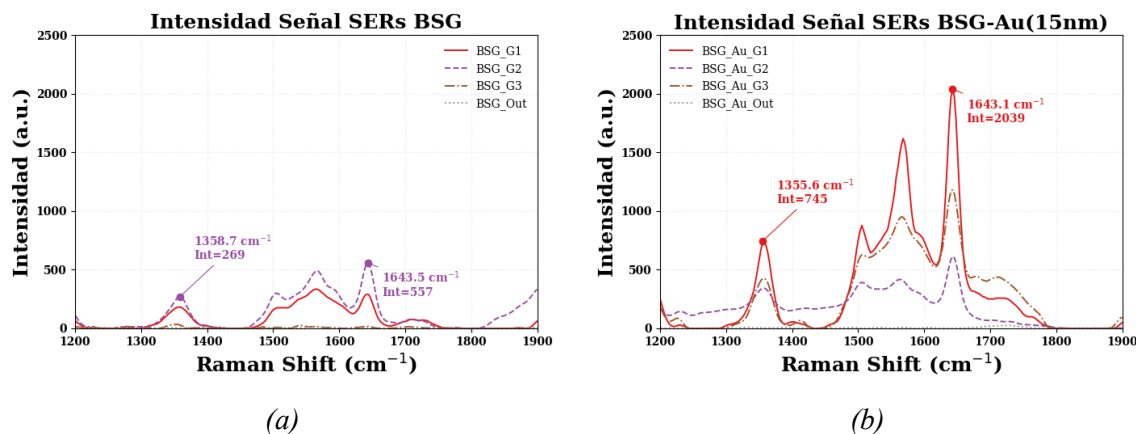
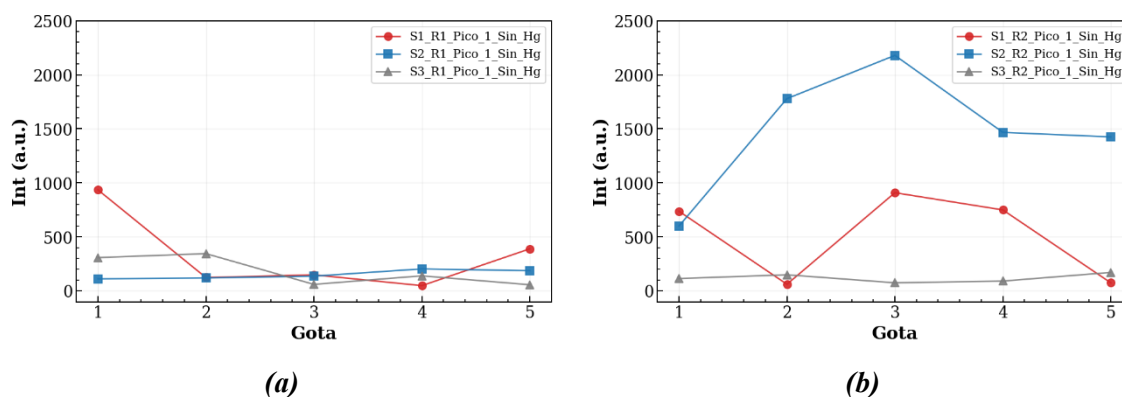


Figura 33. Comparación de espectros de RhB depositada sobre vidrio borosilicato (BSG) y sobre BSG recubierto con Au (~15 nm). El recubrimiento metálico activa el sustrato para SERS, intensificando las bandas características de RhB.

En primer lugar, se confirmó que la deposición de una capa metálica de Au (~15 nm) sobre vidrio de borosilicato (BSG) activa eficazmente la señal SERS de RhB, en contraste con la ausencia de señal apreciable sobre el sustrato desnudo (figura 33). Este resultado valida la necesidad de nanoestructuras plasmónicas para la amplificación óptica [81]. Posteriormente, se evaluaron las tres heteroestructuras bimetalicas Ag/Au —S1 (Ag 10 nm / Au 20 nm), S2 (Ag 15 nm / Au 15 nm) y S3 (Ag 20 nm / Au 10 nm)— en su estado *as-deposited*. Aunque todas exhiben actividad SERS con intensidades en el rango de 10¹–10³ u.a., no se observa una tendencia sistemática entre la configuración de espesores y la magnitud de la señal (figura 34). Esta variabilidad es coherente con los hallazgos morfológicos previos (AFM, SEM), que revelan rugosidades y distribuciones de bordes intergranulares no uniformes, lo que impide establecer una jerarquía clara de desempeño en ausencia de Hg²⁺ [82].



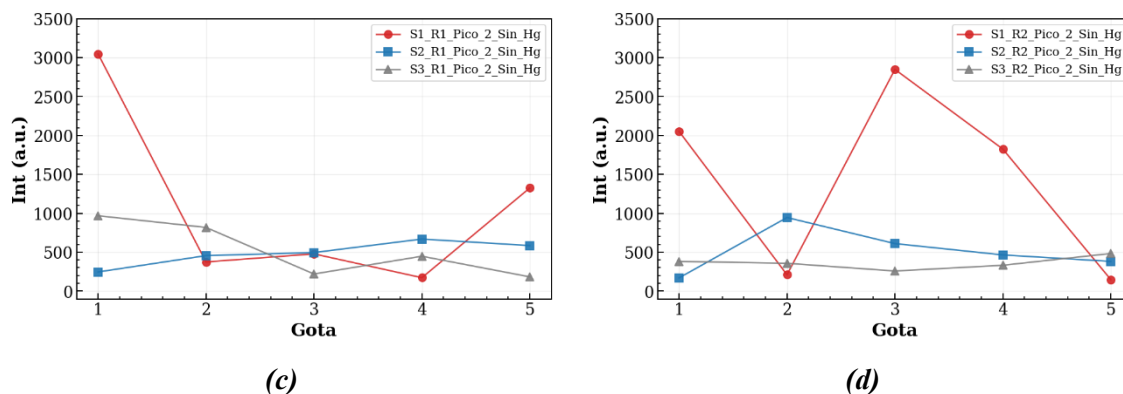
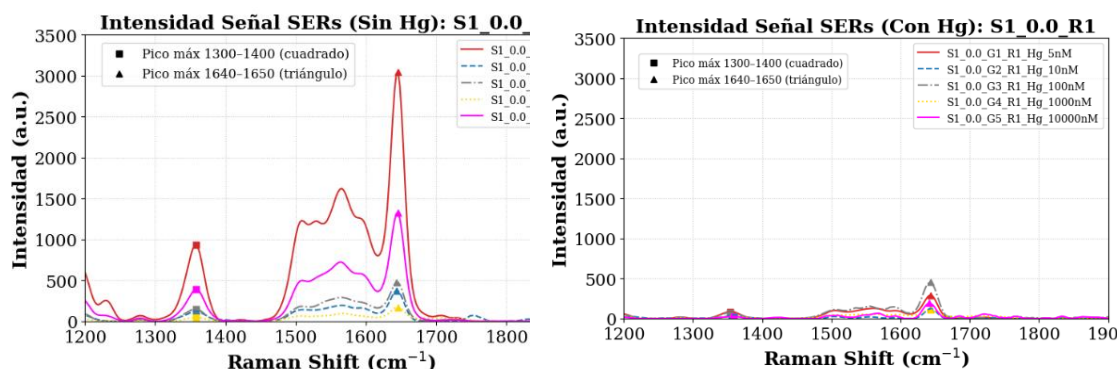


Figura 34. Registro del valor de la intensidad del pico 1 (a)-(b) y del pico 2 (c)-(d) correspondientes a la respuesta SERS de las plataformas S1-S3, *as-deposited*, para dos réplicas (R1 y R2).

La evaluación sensora se realizó mediante la exposición de cada plataforma a soluciones acuosas de Hg^{2+} en concentraciones de 5, 10, 100, 1000 y 10 000 nM. Para cada sistema (S1–S3) se prepararon dos réplicas independientes (R1, R2), y en cada réplica se analizaron cinco gotas (G1–G5) antes y después de la adición del analito. La respuesta se cuantificó mediante la razón normalizada I/I_0 , donde I_0 corresponde a la intensidad SERS de RhB medida en la misma gota antes de la exposición a Hg^{2+} , y I a la intensidad tras la interacción. Este enfoque minimiza parcialmente la variabilidad inherente a SERS, asociada a la heterogeneidad espacial del campo electromagnético local [17].

Los resultados muestran de forma consistente un comportamiento de tipo *turn-off*: en todos los sistemas y réplicas, la señal de RhB disminuye tras la adición de Hg^{2+} , con valores de $I/I_0 < 1$ en ambas bandas espectrales (figuras 35–40). La concordancia entre Pico 1 y Pico 2 en cada medición refuerza la idea de que el apagamiento no es un efecto espectral aislado, sino una respuesta global del sistema [83], [84]. Este fenómeno se interpreta físicamente mediante un mecanismo dual:

1. *Modificación del microentorno plasmónico*: la interacción de Hg^{2+} con las superficies de Ag/Au puede inducir amalgamación superficial o reestructuración local de las nanoislas, alterando las condiciones de resonancia (LSPR). Esto incrementa las pérdidas ópticas y reduce la eficiencia de realce electromagnético.
2. *Competencia en la adsorción superficial*: los iones Hg^{2+} compiten con las moléculas de RhB por sitios de adsorción preferenciales, lo que reduce la fracción de marcador ubicada en regiones de alto campo y atenúa la señal SERS [85].



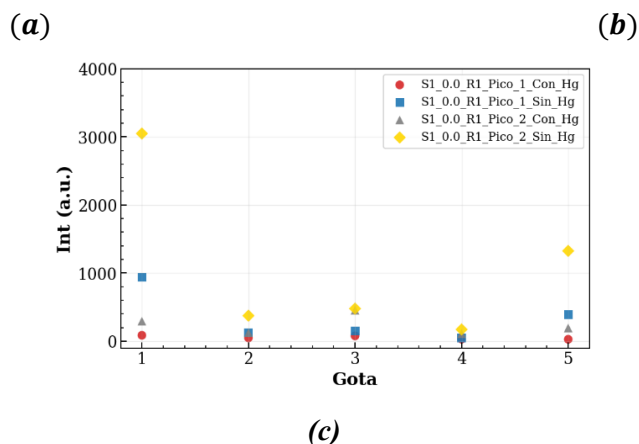


Figura 35. Espectros SERS de RhB para la plataforma **S1_0.0**, réplica R1, medidos en cinco gotas (G1–G5) antes y después de la adición de Hg^{2+} (5–10000 nM). (a) Vista 2D sin interacción con Hg^{2+} ; (b) vista 2D con Hg^{2+} . En el panel (c) se evidencia que la señal SERS del sistema se “apaga” en la **réplica 1 (R1)**, según la indexación.

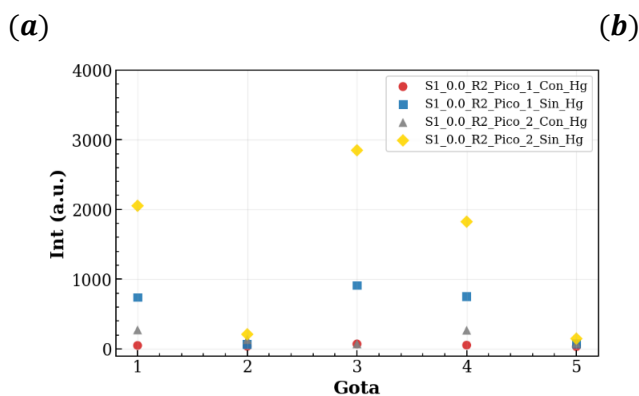
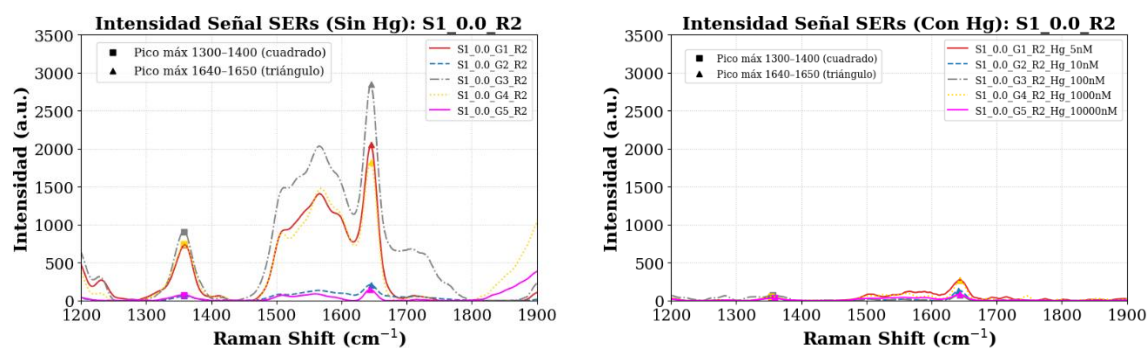


Figura 36. Espectros SERS de RhB para la plataforma **S1_0.0**, réplica R2, medidos en cinco gotas (G1–G5) antes y después de la adición de Hg^{2+} (5–10000 nM). Siendo (a) vista 2D sin interacción con Hg^{2+} ; (b) vista 2D con Hg^{2+} . En el panel (c) se evidencia cómo la señal SERS del sistema se “apaga” en la **réplica 2 (R2)**, según la indexación.

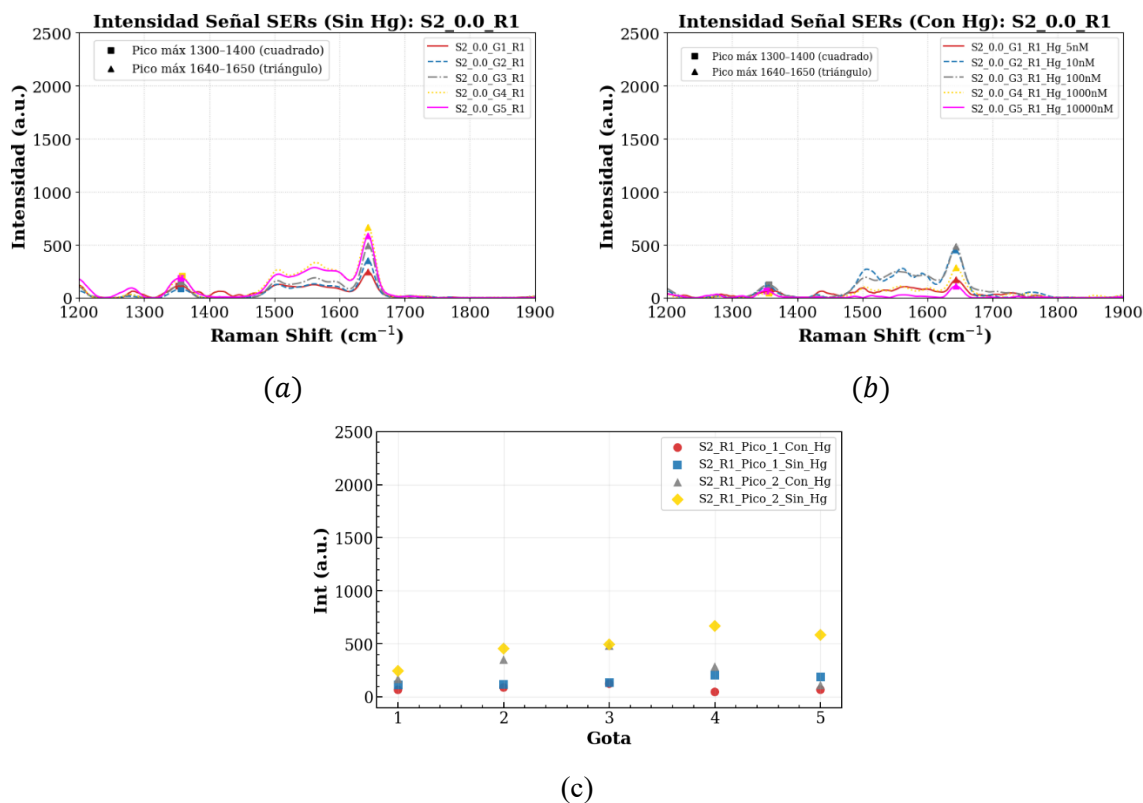
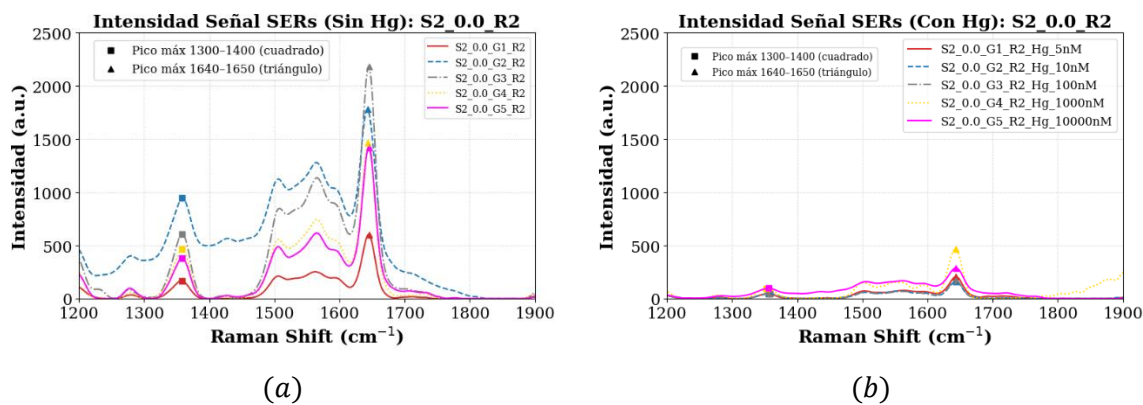
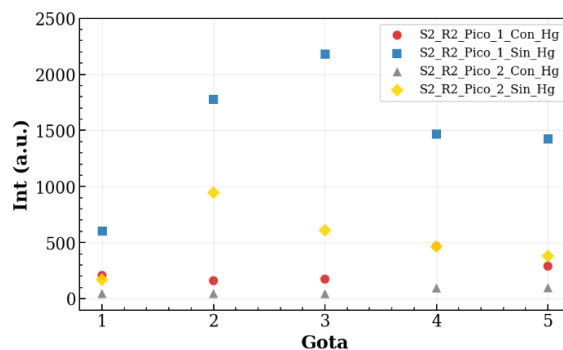


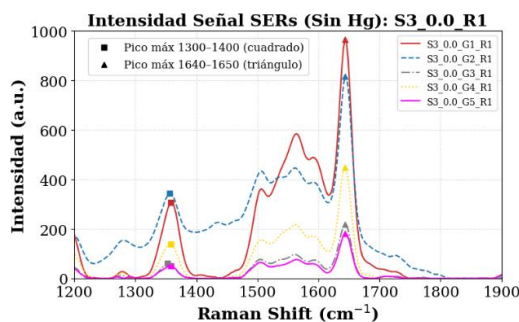
Figura 37. Espectros SERS de RhB para la plataforma **S2_0.0**, réplica **R1**, medidos en cinco gotas (**G1–G5**) antes y después de la adición de Hg^{2+} (5–10000 nM). Siendo (a) vista 2D sin interacción con Hg^{2+} ; (b) vista 2D con Hg^{2+} . En el panel (c) se evidencia cómo la señal SERS del sistema se “apaga” en la **réplica 1 (R1)**, según la indexación



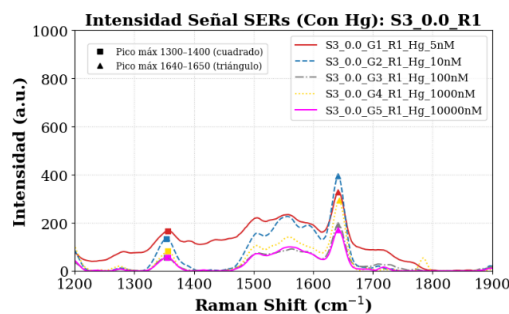


(c)

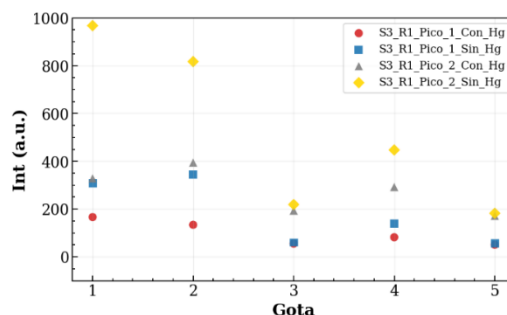
Figura 38. Espectros SERS de RhB para la plataforma **S2_0.0**, réplica R1, medidos en cinco gotas (G1–G5) antes y después de la adición de Hg^{2+} (5–10000 nM). (a) Vista 2D sin interacción con Hg^{2+} ; (b) vista 2D con Hg^{2+} . En el panel (c) se evidencia que la señal SERS del sistema se “apaga” en la **réplica 2 (R2)**, según la indexación.



(a)



(b)



(c)

Figura 39. Espectros SERS de RhB para la plataforma **S3_0.0**, réplica R1, medidos en cinco gotas (G1–G5) antes y después de la adición de Hg^{2+} (5–10000 nM). (a) Vista 2D sin interacción con Hg^{2+} ; (b) vista 2D con Hg^{2+} . En el panel (c) se evidencia que la señal SERS del sistema se “apaga” en la **réplica 1 (R1)**, según la indexación.

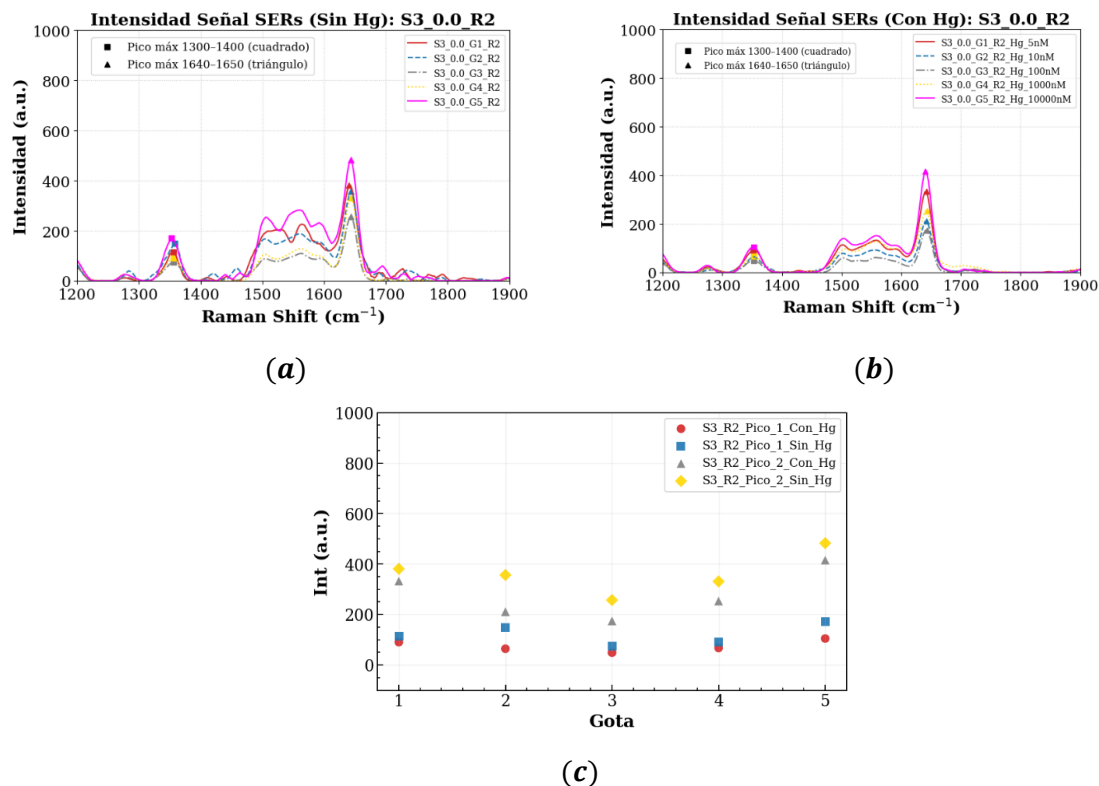
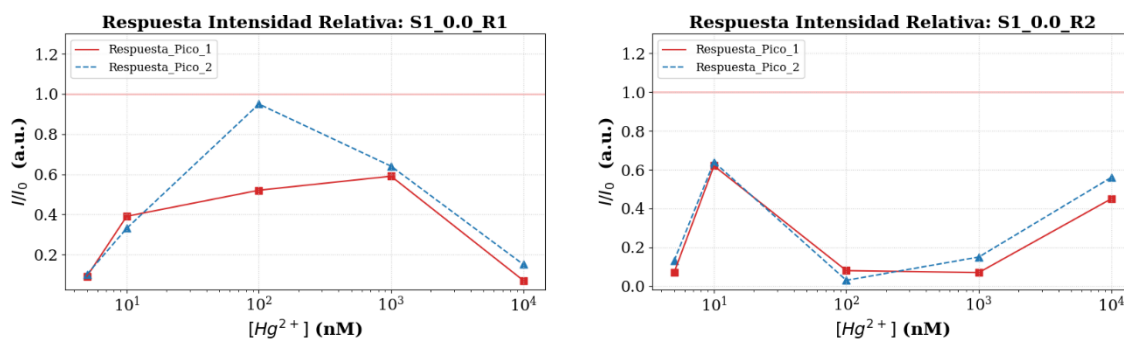


Figura 40. Espectros SERS de RhB para la plataforma **S3_0.0**, réplica R1, medidos en cinco gotas (G1–G5) antes y después de la adición de Hg²⁺ (5–10000 nM). Siendo (a) vista 2D sin interacción con Hg²⁺; (b) vista 2D con Hg²⁺. En el panel (c) se evidencia que la señal SERS del sistema se “apaga” en la **réplica 2 (R2)**, según la indexación.

Aunque no se incluyó un control con agua sin Hg²⁺ ni se evaluó la selectividad frente a otros iones metálicos, la reproducibilidad del apagamiento en múltiples réplicas y concentraciones sugiere que la respuesta está efectivamente ligada a la presencia de Hg²⁺. No obstante, la relación entre I/I_0 y la concentración de Hg²⁺ no muestra una tendencia monótona clara (figura 41), lo cual se atribuye a la morfología granular y no nanoestructurada de los sustratos, como se evidenció previamente mediante perfiles de AFM y anchos de resonancia plasmónica amplios (FWHM elevado). Esta falta de definición en la arquitectura superficial limita la reproducibilidad puntual y favorece efectos de tipo *coffee-ring* durante el secado, que introducen dispersión en la distribución espacial del analito y del marcador [86].



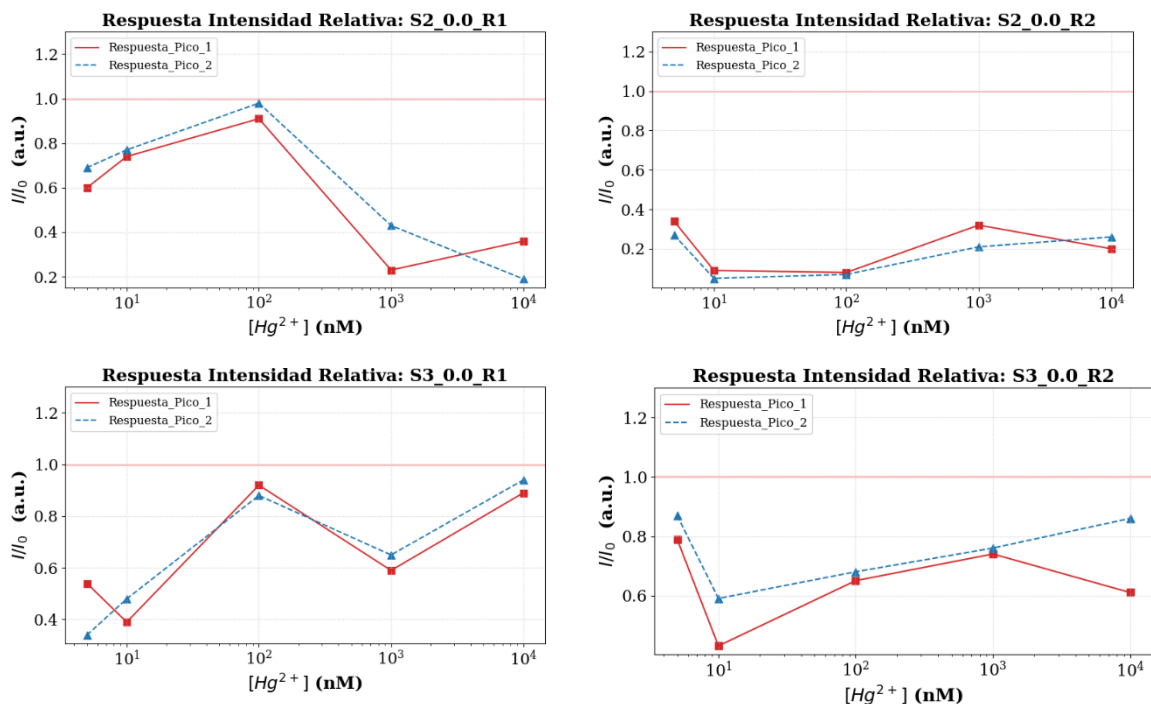


Figura 41. Respuesta SERS normalizada I/I_0 de RhB frente a Hg^{2+} (5–10000 nM) para tres plataformas bimetalicas (S1–S3) y dos réplicas (R1–R2). I/I_0 se calcula integrando dos ventanas espectrales (Pico 1: 1300–1400 cm^{-1} , Pico 2: 1640–1650 cm^{-1}).

En conjunto, los resultados demuestran que las plataformas bimetalicas Ag/Au son capaces de detectar la presencia de Hg^{2+} en agua a concentraciones tan bajas como 5 nM, mediante un mecanismo robusto de apagamiento de la señal SERS. Si bien la respuesta actual no permite una cuantificación precisa, su carácter binario (presencia/ausencia) y su reproducibilidad cualitativa la posicionan como un excelente candidato para sensores de alerta temprana de bajo costo. Futuras optimizaciones deberán enfocarse en la nanoestructuración controlada de la superficie —mediante tratamiento térmico o litografía— para mejorar la homogeneidad del campo plasmónico y habilitar una respuesta cuantitativa.

5.2 Análisis de los resultados

La caracterización topográfica mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) de las heteroestructuras bimetálicas Ag/Au (espesor total de 30 nm), en sus configuraciones *as-deposited* S1, S2 y S3, revela morfologías granulares cuyas características —rugosidad superficial y tamaño de grano— dependen directamente de la proporción relativa Ag:Au. El sistema S1 exhibe la mayor rugosidad promedio ($R_a \approx 5.02$ nm) y un tamaño de grano más pronunciado (~ 65 nm), mientras que S2 presenta valores intermedios ($R_a \approx 2.50$ nm; grano ~ 54.2 nm). Por su parte, S3 muestra la menor rugosidad global ($R_a \approx 1.80$ nm), acompañada de una microestructura compuesta por granos más finos (~ 33.1 nm). Esta variación sistemática en la topografía inicial es fundamental, ya que define la densidad y geometría de bordes, uniones y discontinuidades intergranulares, elementos que modulan la distribución del campo electromagnético local y, en consecuencia, la eficiencia de la señal SERS. Estas características morfológicas establecen las condiciones iniciales para la posterior interacción con especies químicas en solución, particularmente con iones Hg^{2+} .

El tratamiento térmico aplicado a 300 °C induce una evolución morfológica significativa, tal como se observa mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Este proceso, gobernado por el fenómeno de deshumectación en estado sólido, promueve la nucleación y crecimiento de huecos, lo que conduce a la fragmentación de ligamentos metálicos y a la formación progresiva de islas o aglomerados discretos. A tiempos prolongados de recocido, dichas islas experimentan engrosamiento, reduciendo la densidad de interfaces y bordes afilados. Esta dinámica morfológica implica que, si bien el tratamiento térmico inicial potencia la generación de sitios con alta concentración de campo —favorables para la amplificación Raman—, una excesiva coalescencia disminuye la densidad efectiva de tales regiones, afectando negativamente la reproducibilidad y magnitud de la respuesta óptica.

Los análisis por espectroscopía de rayos X dispersiva en energía (EDS) indican que la composición global de Ag y Au en los sistemas S1–S3 permanece esencialmente inalterada tras 3 h de tratamiento térmico. Este resultado confirma que los cambios en el desempeño óptico no se deben a una redistribución química a gran escala, sino a la reconfiguración puramente morfológica de la superficie. En este sentido, la respuesta SERS está dominada por la arquitectura superficial —rugosidad, curvatura local y densidad de bordes— más que por variaciones en la estequiometría bimetálica.

Los difractogramas de rayos X (DRX) obtenidos tras tratamientos térmicos de 0.5 a 1 h a 300 °C muestran únicamente reflexiones compatibles con la estructura cúbica centrada en las caras (fcc), sin evidencia de fases cristalinas secundarias o compuestos intermetálicos. Esto refuerza la interpretación de que la evolución observada es exclusivamente microestructural y morfológica, sin transformaciones de fase detectables por esta técnica.

La validación del efecto SERS se realizó mediante la comparación de las respuestas Raman de la rodamina B (RhB) sobre sustratos de vidrio de borosilicato (sin metal) y plataformas de borosilicato recubiertas con Au (15 nm), ambas sin tratamiento térmico. La ausencia de señal amplificada en el vidrio desnudo y su aparición clara en presencia de Au confirman que la actividad SERS requiere la presencia de nanoestructuras metálicas plasmónicas.

Al evaluar las plataformas bimetálicas S1–S3 en su estado *as-deposited* para la detección de Hg^{2+} en agua, se observa de manera consistente una respuesta de tipo *turn-off*: la intensidad relativa de las bandas Raman características de la RhB (I/I_0) disminuye sistemáticamente ($I/I_0 < 1$) en dos ventanas espectrales clave, independientemente de la proporción Ag:Au. Aunque esta supresión

no permite, en esta etapa, una cuantificación precisa de la concentración de Hg^{2+} —dado que no se observa una tendencia monótona ni convergente de I/I_0 frente a la morfología—, su ocurrencia reproducible y robusta en todas las réplicas y configuraciones estudiadas demuestra que el sistema responde de forma sensible a la presencia de trazas de mercurio inorgánico.

Este comportamiento *on-off* —donde la señal SERS del marcador se apaga en presencia del analito— constituye un mecanismo altamente valioso para aplicaciones de tamizaje ambiental. En particular, la capacidad de generar una alerta temprana, rápida y visualizable ante la presencia de Hg^{2+} , incluso a bajas concentraciones, posiciona a estas heteroestructuras bimetalicas Ag/Au como excelentes candidatas para sensores de bajo costo, específicos y operativos en entornos acuosos. La optimización futura de la morfología —mediante el control de la relación Ag:Au y de los parámetros térmicos— permitirá afinar la sensibilidad y transitar hacia una respuesta cuantitativa, alineándose plenamente con el objetivo general de desarrollar nanosensores plasmónicos eficientes para la vigilancia de contaminantes metálicos en recursos hídricos.

6 Conclusiones

Se logró la fabricación reproducible de heteroestructuras bimetálicas Ag-Au mediante deposición física en fase de vapor, obteniendo tres sistemas (S1–S3) con proporciones controladas de Ag y Au y espesor total de 30 nm. Estas nanoestructuras, tanto en estado *as-deposited* como tras tratamiento térmico a 300 °C, exhiben morfologías estables y ajustables mediante la composición inicial, lo que demuestra la viabilidad del método para producir plataformas sensoras escalables y de bajo costo.

La caracterización integral —mediante AFM, SEM, EDS, DRX y espectroscopía Raman— permitió establecer una correlación directa entre la composición Ag:Au, la evolución morfológica inducida por deshumectación en estado sólido, y la respuesta óptica plasmónica. Los resultados confirman que la arquitectura superficial —rugosidad, tamaño de grano y densidad de bordes—, más que la composición química global o los cambios de fase cristalina, gobierna la actividad SERS. Esta comprensión detallada de las propiedades fisicoquímicas fundamenta el diseño racional de sensores plasmónicos basados en dichos materiales.

La evaluación experimental con muestras acuosas que contenían Hg^{2+} demostró que las plataformas S1–S3 responden de forma sensible y reproducible a la presencia del ión, evidenciada por una supresión consistente o atenuación (*turn-off*) de la señal SERS de la rodamina B. Aunque el mecanismo es indirecto —basado en la perturbación de la adsorción del marcador por la interacción con Hg^{2+} —, el sistema permite detectar trazas del contaminante incluso a bajas concentraciones, cumpliendo con los requisitos de un sensor cualitativo binario (presencia/ausencia).

Finalmente, este trabajo ha demostrado que las heteroestructuras bimetálicas Ag-Au, con morfologías controladas mediante la relación de composición y procesamiento térmico, constituyen una plataforma plasmónica altamente prometedora para la detección de mercurio inorgánico en agua. Al vincular explícitamente las propiedades estructurales y morfológicas con la respuesta óptica y la sensibilidad al analito, se ha sentado una base sólida para el desarrollo de nanosensores de bajo costo, robustos y operativos en entornos reales de nuestra región. El comportamiento *on-off* observado, aunque aún cualitativo, representa un avance significativo hacia sistemas de alerta temprana para la vigilancia ambiental de metales pesados y se alinea plenamente con el objetivo general de esta investigación.

7 Perspectivas y trabajos futuros

- Se propone optimizar de manera sistemática el proceso de recocido térmico, considerando el SSD como una estrategia de nanoestructuración controlada. Para ello, se sugiere explorar tiempos entre 0.25 y 6 h y temperaturas entre 250 y 350 °C. El objetivo es maximizar el desempeño de SERS, sin inducir un crecimiento excesivo de las islas metálicas que comprometa desempeño. Establecer el tiempo de recocido como variable, mediante la correlación morfología–óptica–SERS, para cada tiempo de tratamiento térmico, correlacionar: (i) métricas morfológicas extraídas de SEM/AFM (densidad de huecos, distribución de separaciones, tamaño de islas), (ii) respuesta UV–Vis/LSPR (corrimiento y ensanchamiento), y (iii) desempeño SERS mediante ratiometría I/I_0 , si aplica, establecer curvas de calibración y RSD a través de mapeos. Esto convierte el recocido en una variable explicativa y no solo descriptiva.
- Se plantea establecer el tiempo de recocido como una variable explicativa central mediante una correlación directa entre la morfología, las propiedades ópticas y la respuesta SERS. Para cada condición de tratamiento térmico, se deberán correlacionar: (i) métricas morfológicas extraídas de SEM/AFM (densidad de huecos, distribución de separaciones, tamaño medio de nanoestructuraciones), (ii) la respuesta óptica UV–Vis/LSPR (corrimientos espectrales y ensanchamiento de las bandas plasmónicas), y (iii) el desempeño SERS, evaluado mediante la razón normalizada I/I_0 .
- Se recomienda implementar micromapeos sistemáticos (por ejemplo, matrices de 5×5 o 10×10 puntos por gota) para cuantificar la variabilidad espacial de la señal SERS. Dado que estos sistemas operan en un régimen dominado por *hot spots*, la intensidad medida depende fuertemente del microentorno local. El análisis estadístico de estos mapas permitirá reportar valores de RSD representativos y fortalecer la evaluación de reproducibilidad, elevando el argumento de desempeño al nivel esperado en estudios doctorales.
- Se propone incluir de forma sistemática un blanco procedimental (segunda gota sin Hg^{2+}) para discriminar entre los efectos asociados a la interacción con el analito y los derivados de la rehumectación o redistribución del marcador durante el secado. Asimismo, se deberá controlar el proceso de deposición (humedad ambiental, confinamiento de la gota y geometría del sustrato) con el fin de mitigar las variaciones inducidas por efectos tipo coffee-ring. Alternativamente, dichos efectos podrían ser reproducibles si se logra un control adecuado de las condiciones de secado.
- En plataformas tratadas térmicamente, se sugiere incorporar evidencia directa del mecanismo de interacción Hg–superficie mediante la caracterización SEM/AFM posterior a la exposición al analito. Esta estrategia permitiría evaluar posibles cambios morfológicos inducidos por Hg^{2+} , modificaciones en la respuesta LSPR y, cuando fuera posible, indicios de química superficial asociada (oxidación, contaminación o interacción Hg–metal). Adicionalmente, será importante estudiar el envejecimiento del sustrato y su estabilidad térmica y ambiental, especialmente considerando el aumento de discontinuidad superficial inducido por el SSD.

8 Bibliografía

- [1] U. N. Environment, «Global Mercury Assessment 2018 | UNEP - UN Environment Programme». Accedido: 23 de abril de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://www.unep.org/resources/publication/global-mercury-assessment-2018>
- [2] *Toxicological Profile for Mercury*. en Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Toxicological Profiles. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), 2024. Accedido: 27 de septiembre de 2025. [En línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK611017/>
- [3] Martin, «Goal 6: Water and Sanitation», United Nations Sustainable Development. Accedido: 11 de noviembre de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/water-and-sanitation/>
- [4] «Mercury | National Institute of Environmental Health Sciences». Accedido: 23 de abril de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/mercury>
- [5] W. H. Organization y I. P. on C. Safety, *Methylmercury*. World Health Organization, 1990. Accedido: 26 de agosto de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/38082>
- [6] O. US EPA, «National Primary Drinking Water Regulations». Accedido: 11 de noviembre de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>
- [7] «Directive - 2020/2184 - EN - EUR-Lex». Accedido: 14 de agosto de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj/eng>
- [8] «informe ideam minería ilegal - Google Search». Accedido: 13 de julio de 2025. [En línea]. Disponible en: https://www.google.com/search?q=informe+ideam+minería+ilegal&rlz=1C1VDKB_esCO1113CO1113&oq=informe+ideam+minería+&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUqBwgBECEYoAEyBggAEEUYOTIHCAEQIRigATIHCAIQIRigAdIBCTExMDQzajBqNKgCALACAQ&sourceid=chrome&ie=UTF-8
- [9] «[Informe] El Convenio de Minamata sobre el Mercurio y su implementación en la región de América Latina y el Caribe | Minamata Convention on Mercury». Accedido: 2 de julio de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://minamataconvention.org/es/resources/informe-el-convenio-de-minamata-sobre-el-mercurio-y-su-implementacion-en-la-region-de>
- [10] O. US EPA, «EPA Method 245.1: Determination of Mercury in Water by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry». Accedido: 14 de agosto de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.epa.gov/esam/epa-method-2451-determination-mercury-water-cold-vapor-atomic-absorption-spectrometry>
- [11] «NEMI Method Summary - 1631». Accedido: 25 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: https://www.nemi.gov/methods/method_summary/9628/
- [12] O. US EPA, «EPA Method 200.8: Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry». Accedido: 13 de julio de 2025. [En línea].

Disponible en: <https://www.epa.gov/esam/epa-method-2008-determination-trace-elements-waters-and-wastes-inductively-coupled-plasma-mass>

- [13] S. Pang, T. Yang, y L. He, «Review of surface enhanced Raman spectroscopic (SERS) detection of synthetic chemical pesticides», *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 85, pp. 73-82, dic. 2016, doi: 10.1016/j.trac.2016.06.017.
- [14] J. Guo, Y. Liu, H. Ju, y G. Lu, «From lab to field: Surface-enhanced Raman scattering-based sensing strategies for on-site analysis», *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 146, p. 116488, ene. 2022, doi: 10.1016/j.trac.2021.116488.
- [15] S. Lopez-Restrepo, A. Yarce, N. Pinel, O. L. Quintero, A. Segers, y A. W. Heemink, «Urban Air Quality Modeling Using Low-Cost Sensor Network and Data Assimilation in the Aburrá Valley, Colombia», *Atmosphere*, vol. 12, n.º 1, ene. 2021, doi: 10.3390/atmos12010091.
- [16] R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, y L. Fabris, «A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering», *Biosensors*, vol. 9, n.º 2, p. 57, abr. 2019, doi: 10.3390/bios9020057.
- [17] Y. Wu *et al.*, «Recent advances in ratiometric surface-enhanced Raman spectroscopy sensing strategies», *Microchem. J.*, vol. 199, p. 110127, abr. 2024, doi: 10.1016/j.microc.2024.110127.
- [18] X. Zhao *et al.*, «SERS detection of Hg²⁺ and aflatoxin B1 through on–off strategy of oxidase-like Au@HgNPs/carbon dots», *Food Chem.*, vol. 424, p. 136443, oct. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136443.
- [19] H. Oh, A. Pyatenko, y M. Lee, «Laser dewetting behaviors of Ag and Au thin films on glass and Si substrates: Experiments and theoretical considerations», *Appl. Surf. Sci.*, vol. 475, pp. 740-747, may 2019, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.01.055.
- [20] J. Yi *et al.*, «Surface-enhanced Raman spectroscopy: a half-century historical perspective», *Chem. Soc. Rev.*, vol. 54, n.º 3, pp. 1453-1551, feb. 2025, doi: 10.1039/D4CS00883A.
- [21] M. Moran, «Agua y saneamiento», *Desarrollo Sostenible*. Accedido: 1 de octubre de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/water-and-sanitation/>
- [22] A. Soni, R. Sharma, D. S. Rana, D. Singh, y N. Gupta, «Structural designs of functional metal organic frameworks for the detection of mercury in contaminated water sources», *Coord. Chem. Rev.*, vol. 494, p. 215343, nov. 2023, doi: 10.1016/j.ccr.2023.215343.
- [23] T. Hou, M. Chen, G. W. Greene, y R. G. Horn, «Mercury Vapor Sorption and Amalgamation with a Thin Gold Film», *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, n.º 41, pp. 23172-23181, oct. 2015, doi: 10.1021/acsami.5b07002.
- [24] D. Xu, S. Yu, Y. Yin, S. Wang, Q. Lin, y Z. Yuan, «Sensitive Colorimetric Hg²⁺ Detection via Amalgamation-Mediated Shape Transition of Gold Nanostars», *Front. Chem.*, vol. 6, p. 566, nov. 2018, doi: 10.3389/fchem.2018.00566.
- [25] W. Ren, C. Zhu, y E. Wang, «Enhanced sensitivity of a direct SERS technique for Hg²⁺ detection based on the investigation of the interaction between silver nanoparticles and mercury ions», *Nanoscale*, vol. 4, n.º 19, pp. 5902-5909, sep. 2012, doi: 10.1039/C2NR31410J.

- [26] C. V. Thompson, «Solid-State Dewetting of Thin Films», *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 42, n.º Volume 42, 2012, pp. 399-434, ago. 2012, doi: 10.1146/annurev-matsci-070511-155048.
- [27] «Preparation of alloyed and “core-shell” Au/Ag bimetallic nanostructures on glass substrate by solid state dewetting - ScienceDirect». Accedido: 13 de julio de 2025. [En línea]. Disponible en: [https://www.sciencedirect-com.bd.univalle.edu.co/science/article/pii/S0925838820309907](https://www.sciencedirect.com.bd.univalle.edu.co/science/article/pii/S0925838820309907)
- [28] B. P. Nanda, P. Rani, P. Paul, Aman, S. S. Ganti, y R. Bhatia, «Recent trends and impact of localized surface plasmon resonance (LSPR) and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) in modern analysis», *J. Pharm. Anal.*, vol. 14, n.º 11, p. 100959, nov. 2024, doi: 10.1016/j.jpha.2024.02.013.
- [29] J.-F. Masson, «Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors», *Analyst*, vol. 145, n.º 11, pp. 3776-3800, jun. 2020, doi: 10.1039/D0AN00316F.
- [30] D. Radziuk y H. Moehwald, «Prospects for plasmonic hot spots in single molecule SERS towards the chemical imaging of live cells», *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, n.º 33, pp. 21072-21093, 2015, doi: 10.1039/C4CP04946B.
- [31] O. Pluchery, Y. Prado, y W. Watkins, «A complete explanation of the plasmonic colours of gold nanoparticles and of the bichromatic effect», *J. Mater. Chem. C*, vol. 11, n.º 45, pp. 15824-15832, nov. 2023, doi: 10.1039/D3TC02669H.
- [32] R. K. Rakshit, S. Bhattacharya, y R. C. Budhani, «Quenching of surface plasmon modes in colloidal silver nanoparticles on ozonization», *Nano*, vol. 01, n.º 03, pp. 229-234, nov. 2006, doi: 10.1142/S1793292006000240.
- [33] A. Kumar y D. V. Goia, «Comparative Analysis of Commercial Colloidal Silver Products», *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, pp. 10425-10434, dic. 2020, doi: 10.2147/IJN.S287730.
- [34] S. N. Bonvicini y Y. Shi, «Formation and Removal of Alloyed Bimetallic Au–Ag Nanoparticles from Silicon Substrates for Tunable Surface Plasmon Resonance», *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 5, n.º 10, pp. 14850-14861, oct. 2022, doi: 10.1021/acsanm.2c03154.
- [35] O. E. Babawale y L. Gundlach, «Fabrication of Large-Area Fully Alloyed Ag/Au Nanoparticle Arrays», *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 6, n.º 23, pp. 21866-21875, dic. 2023, doi: 10.1021/acsanm.3c04070.
- [36] K. Kneipp, M. Moskovits, y H. Kneipp, Eds., *Surface-Enhanced Raman Scattering*. en Topics in Applied Physics. Springer Berlin Heidelberg, 2006. doi: 10.1007/3-540-33567-6.
- [37] P. Yu, C. Shen, X. Yin, J. Cheng, C. Liu, y Z. Yu, «Au-Ag Bimetallic Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Detection of Food Contaminants: A Review», *Foods*, vol. 14, n.º 12, Art. n.º 12, ene. 2025, doi: 10.3390/foods14122109.
- [38] E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, y P. G. Etchegoin, «Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study», *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, n.º 37, pp. 13794-13803, sep. 2007, doi: 10.1021/jp0687908.
- [39] E. C. Le Ru y P. G. Etchegoin, «Quantifying SERS enhancements», *MRS Bull.*, vol. 38, n.º 8, pp. 631-640, ago. 2013, doi: 10.1557/mrs.2013.158.

- [40] P. Ma *et al.*, «Selective and sensitive SERS sensor for detection of Hg²⁺ in environmental water base on rhodamine-bonded and amino group functionalized SiO₂-coated Au–Ag core–shell nanorods», *RSC Adv.*, vol. 5, n.º 41, pp. 32168-32174, abr. 2015, doi: 10.1039/C5RA04423E.
- [41] C.-Y. Lin, C.-J. Yu, Y.-H. Lin, y W.-L. Tseng, «Colorimetric Sensing of Silver(I) and Mercury(II) Ions Based on an Assembly of Tween 20-Stabilized Gold Nanoparticles», *Anal. Chem.*, vol. 82, n.º 16, pp. 6830-6837, ago. 2010, doi: 10.1021/ac1007909.
- [42] J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, y R. P. Van Duyne, «Biosensing with plasmonic nanosensors», *Nat. Mater.*, vol. 7, n.º 6, pp. 442-453, jun. 2008, doi: 10.1038/nmat2162.
- [43] A. D. McFarland y R. P. Van Duyne, «Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity», *Nano Lett.*, vol. 3, n.º 8, pp. 1057-1062, ago. 2003, doi: 10.1021/nl034372s.
- [44] A. Isabel Pérez-Jiménez, D. Lyu, Z. Lu, G. Liu, y B. Ren, «Surface-enhanced Raman spectroscopy: benefits, trade-offs and future developments», *Chem. Sci.*, vol. 11, n.º 18, pp. 4563-4577, 2020, doi: 10.1039/D0SC00809E.
- [45] «BibliotecaDigital - Todos los documentos». Accedido: 26 de agosto de 2025. [En línea]. Disponible en: https://www.ins.gov.co/bibliotecadigital/forms/allitems.aspx?PageFirstRow=7291&Paged=TRUE&View=%7B59CDA708-F2EE-432E-AFE7-173708175EF0%7D&p_ID=2072&p_SortBehavior=0&utm_source=chatgpt.com
- [46] «Mercury». Accedido: 14 de agosto de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/water-sanitation-and-health/chemical-hazards-in-drinking-water/mercury>
- [47] C. Tian, L. Zhao, J. Zhu, y S. Zhang, «Ultrasensitive detection of trace Hg²⁺ by SERS aptasensor based on dual recycling amplification in water environment», *J. Hazard. Mater.*, vol. 416, p. 126251, ago. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126251.
- [48] O. Kvitek, V. Havelka, M. Vesely, A. Reznickova, y V. Svorcik, «Preparation of alloyed and “core-shell” Au/Ag bimetallic nanostructures on glass substrate by solid state dewetting», *J. Alloys Compd.*, vol. 829, p. 154627, jul. 2020, doi: 10.1016/j.jallcom.2020.154627.
- [49] E. Babich, I. Reduto, y A. Lipovskii, «Diffusive Formation of Au/Ag Alloy Nanoparticles of Governed Composition in Glass», *Nanomater. Basel Switz.*, vol. 12, n.º 23, p. 4202, nov. 2022, doi: 10.3390/nano12234202.
- [50] «Materials Science of Thin Films», ScienceDirect. Accedido: 24 de abril de 2026. [En línea]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com:5070/book/monograph/9780125249751/materials-science-of-thin-films>
- [51] *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing*. 2010. Accedido: 24 de abril de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://shop.elsevier.com/books/handbook-of-physical-vapor-deposition-pvd-processing/mattox/978-0-8155-2037-5>

- [52] «Thin-Film Deposition: Principles and Practice | Semantic Scholar». Accedido: 24 de abril de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Thin-Film-Deposition%3A-Principles-and-Practice-Smith-Hoffman/ed35d29dc4f32ec3efd913ff316a7c1eb7a5879e>
- [53] M. El-Shabasy, «PERSPECTIVE OF ADHESION OF THIN FILMS», *Period. Polytech. Electr. Eng. Arch.*, vol. 25, n.º 2, pp. 123-134, 1981.
- [54] F. S. Honey, «Deposition of adherent Ag-Ti duplex films on ceramics in a multiple-cathode sputter deposition system», NAS 1.15:105586, abr. 1992. Accedido: 4 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://ntrs.nasa.gov/citations/19920013982>
- [55] *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing*. 2010. Accedido: 2 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://shop.elsevier.com/books/handbook-of-physical-vapor-deposition-pvd-processing/mattox/978-0-8155-2037-5>
- [56] *Materials Science of Thin Films*. 2001. Accedido: 4 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://shop.elsevier.com/books/materials-science-of-thin-films/ohring/978-0-12-524975-1>
- [57] G. Sauerbrey, «Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung», *Z. Für Phys.*, vol. 155, n.º 2, pp. 206-222, abr. 1959, doi: 10.1007/BF01337937.
- [58] D. Johannsmann, A. Langhoff, C. Leppin, D. Johannsmann, A. Langhoff, y C. Leppin, «Studying Soft Interfaces with Shear Waves: Principles and Applications of the Quartz Crystal Microbalance (QCM)», *Sensors*, vol. 21, n.º 10, may 2021, doi: 10.3390/s21103490.
- [59] M. Liszewska, B. Budner, M. Norek, B. J. Jankiewicz, y P. Nyga, «Revisiting semicontinuous silver films as surface-enhanced Raman spectroscopy substrates», *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 10, n.º 1, pp. 1048-1055, may 2019, doi: 10.3762/bjnano.10.105.
- [60] «Atomic Force Microscopy (AFM) - WITec Raman Imaging», Oxford Instruments. Accedido: 5 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://raman.oxinst.com/products/imaging-options/raman-afm>
- [61] K. V. Dahl, «Fractography analysis of tool samples used for cold forging», IPL, Report, 2002.
- [62] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, J. R. Michael, N. W. M. Ritchie, J. H. J. Scott, y D. C. Joy, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York, NY: Springer, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-6676-9.
- [63] W. H. Bragg y W. L. Bragg, «The reflection of X-rays by crystals», *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Contain. Pap. Math. Phys. Character*, vol. 88, n.º 605, pp. 428-438, jul. 1913, doi: 10.1098/rspa.1913.0040.
- [64] G. F. Harrington y J. Santiso, «Back-to-Basics tutorial: X-ray diffraction of thin films», *J. Electroceramics*, vol. 47, n.º 4, pp. 141-163, dic. 2021, doi: 10.1007/s10832-021-00263-6.
- [65] G. Lim, W. Parrish, C. Ortiz, M. Bellotto, y M. Hart, «Grazing incidence synchrotron x-ray diffraction method for analyzing thin films», *J. Mater. Res.*, vol. 2, n.º 4, pp. 471-477, jul. 1987, doi: 10.1557/JMR.1987.0471.

- [66] Y. Zhang, G. Shi, Y. Zhang, y G. Shi, «Origin of Blue-Water Jadeite Jades from Myanmar and Guatemala: Differentiation by Non-Destructive Spectroscopic Techniques», *Crystals*, vol. 12, n.º 10, oct. 2022, doi: 10.3390/cryst12101448.
- [67] K. Burkhardt, «Introducing JASCO's New V-700 Series UV-VIS/NIR Spectrophotometers», JASCO Inc. Accedido: 8 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://jascoinc.com/news/introducing-jascos-new-v-700-series-uv-visnir-spectrophotometers/>
- [68] «Integrating Spheres : SHIMADZU (Shimadzu Corporation)». Accedido: 8 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: https://www.shimadzu.com/es-es/an/service-support/technical-support/uv/essential_knowledge/integratingspheres.html?utm_source=chatgpt.com
- [69] «Spectralon® Diffuse Reflectance Standards», Labsphere. Accedido: 8 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://www.labsphere.com/product/spectralon-diffuse-reflectance-standards/>
- [70] Y. Huang *et al.*, «Detection of Buried Explosives Using a Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Substrate Tailored for Miniaturized Spectrometers», *ACS Sens.*, vol. 5, n.º 9, pp. 2933-2939, sep. 2020, doi: 10.1021/acssensors.0c01412.
- [71] S. Schlücker, «Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications», *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 53, n.º 19, pp. 4756-4795, may 2014, doi: 10.1002/anie.201205748.
- [72] T. N. Thuy Nguyen *et al.*, «Research on developing SERS substrates based on a ZnO porous membrane decorated with silver nanoparticles aimed at detecting low concentrations of Rhodamine B», oct. 2025, doi: 10.1039/D5RA06188A.
- [73] C. A. Visbal *et al.*, «The Fabrication of Gold Nanostructures as SERS Substrates for the Detection of Contaminants in Water», *Nanomaterials*, vol. 14, n.º 18, Art. n.º 18, ene. 2024, doi: 10.3390/nano14181525.
- [74] T. Walther, «Recent improvements in quantification of energy-dispersive X-ray spectra and maps in electron microscopy of semiconductors», *Appl. Res.*, vol. 3, n.º 6, p. e202300128, 2024, doi: 10.1002/appl.202300128.
- [75] N. J. Borys, E. Shafran, y J. M. Lupton, «Surface plasmon delocalization in silver nanoparticle aggregates revealed by subdiffraction supercontinuum hot spots», *Sci. Rep.*, vol. 3, n.º 1, p. 2090, jun. 2013, doi: 10.1038/srep02090.
- [76] A. Landa *et al.*, «Analytic Binary Alloy Volume–Concentration Relations and the Deviation from Zen's Law», *Appl. Sci.*, vol. 11, n.º 13, jul. 2021, doi: 10.3390/app11136231.
- [77] J. Ji y Z. Li, «Thermally generated Au–Ag nanostructures with tunable localized surface plasmon resonance as SERS activity substrates», *Heliyon*, vol. 9, n.º 7, p. e17749, jul. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e17749.
- [78] S. N. Kabekkodu, A. Dosen, y T. N. Blanton, «PDF-5+: a comprehensive Powder Diffraction File™ for materials characterization», *Powder Diffr.*, vol. 39, n.º 2, pp. 47-59, jun. 2024, doi: 10.1017/S0885715624000150.
- [79] «ICDD Database Search -». Accedido: 26 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://www.icdd.com/pdfsearch/>

- [80] M. Moskovits, «Surface-enhanced spectroscopy», *Rev. Mod. Phys.*, vol. 57, n.º 3, pp. 783-826, jul. 1985, doi: 10.1103/RevModPhys.57.783.
- [81] «Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering | ACS Nano». Accedido: 25 de enero de 2026. [En línea]. Disponible en: <https://pubs-acsc-org.bd.univalle.edu.co/doi/10.1021/acsnano.9b04224>
- [82] E. C. Le Ru, *Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy and related plasmonic effects*, 1st ed. Amsterdam ; Elsevier, 2009.
- [83] Z. He *et al.*, «Plasmonic MOF for Highly Selective SERS Sensing of Trace Mercury (II) in Complex Matrices», *Small*, vol. 21, n.º 10, p. 2409988, 2025, doi: 10.1002/sml.202409988.
- [84] C. Song, B. Yang, Y. Yang, y L. Wang, «SERS-based mercury ion detections: principles, strategies and recent advances», *Sci. China Chem.*, vol. 59, n.º 1, pp. 16-29, ene. 2016, doi: 10.1007/s11426-015-5504-9.
- [85] W. Ren, C. Zhu, y E. Wang, «Enhanced sensitivity of a direct SERS technique for Hg²⁺ detection based on the investigation of the interaction between silver nanoparticles and mercury ions», *Nanoscale*, vol. 4, n.º 19, pp. 5902-5909, sep. 2012, doi: 10.1039/C2NR31410J.
- [86] A. S. Rourke-Funderburg, A. B. Walter, B. Carroll, A. Mahadevan-Jansen, y A. K. Locke, «Development of a Low-Cost Paper-Based Platform for Coffee Ring-Assisted SERS», *ACS Omega*, vol. 8, n.º 37, pp. 33745-33754, sep. 2023, doi: 10.1021/acsomega.3c03690.