



Interreg
España - Portugal



Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



Informe de progreso sobre la evolución morfológica de las nanopartículas de TiO₂ y Ag.

Actividad 4 – Acción 1 – Entregable E 1



ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
1. Objetivo del Entregable E1.....	2
2. Metodología	2
a. Muestras.....	2
b. DLS.....	4
c. Espectroscopia UV-Vis.....	4
3. Resultados	4
4. Conclusiones.....	6

1. Objetivo del Entregable E1

El objetivo global del entregable fue colectar información válida y fiable sobre la transformación en agua de mar de las nanoparticulas seleccionadas para estudiar en este proyecto:

- Nanopartículas de plata (AgNPs) de un diámetro de 100 nm y recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) en un ratio Ag:PVP de 25:75 wt%. Estas nanopartículas tendrán la etiqueta de PVP-100nmAgNPs en el resto del informe.
- Nanopartículas de óxido de titanio (TiO_2) de un diámetro de 45 nm y recubiertas con citrato en un ratio TiO_2 :citrato de 1:1.5 wt %. Estas nanopartículas tendrán la etiqueta de citrato-45nm TiO_2 NPs en el resto del informe.

2. Metodología

a. Muestras

Las PVP-100nmAgNPs fueron preparados a partir de una tinta conductora que contenía 30% wt AgNPs de 100 nm dispersados en glicol de etileno (Sigma-Aldrich, código de producto 798738). Para remover el glicol de etileno debido a su toxicidad¹, 4 g de la tinta conductora fueron diluidas en agua ultrapura para alcanzar una concentración de glicol de etileno de 0.15 – 0.3 M (sobre 30 – 15 mL volumen final). La tinta diluida fue entonces dializada usando una membrana de celulosa 12 kDa (Sigma-Aldrich, código de producto: D6191) frente agua ultrapura por 6 h. Después de la dialisis, las AgNPs fueron mezclada con 24 mL de 150 g/L de una disolución de PVP, obteniendo un ratio de Ag:PVP de 25:75 %wt. La dispersión de PVP-Ag100nm se guardó a 4 C hasta su uso. Los procesos de purificación y el recubrimiento con PVP de estas AgNPs fueron caracterizadas por dispersión de luz dinámica (DLS; SZ-100 device, Horiba) y espectroscopía UV-Vis (Perkin-Elmer LAMBDA 950). Los resultados se muestran en la Figura 1.

¹ Moore, M.M.; Kanekar, S.G.; Dhamija, R. Ethylene Glycol Toxicity: Chemistry, Pathogenesis, and Imaging. Radiol. Case Rep. 2008, 3, 122, doi:10.2484/rccr.v3i1.122.

NPs	[NPs] / mg/L	D _H ^a (PDI) ^b / nm
		Ultrapure water
EG^c-100nmAgNPs	13.3	120 ± 1 (0.19 ± 0.06)
Purified EG-100nmAgNPs	60	110 ± 2 (0.28 ± 0.04)
PVP-100nmAgNPs	60	120 ± 1 (0.29 ± 0.04)
Lyophilized PVP-100nmAgNPs	60	131 ± 1 (0.25 ± 0.04)

^aMean hydrodynamic diameter was obtained by DLS at room temperature and at a scattering angle of 90° for 60 s. DLS measurements were carried out on 5 runs: Mean ± Standard desviation (SD).

^bPolydispersity index

^cEG=Ethylene glycol

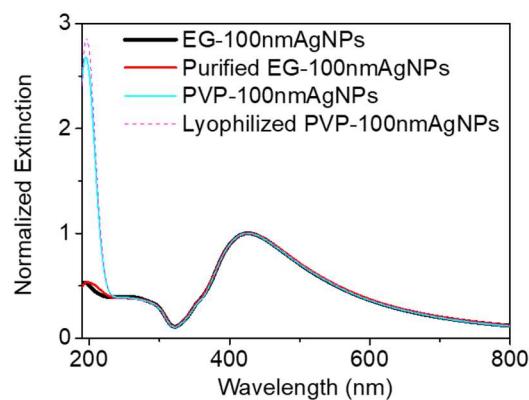


Figura 1. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs con un diámetro de 100 nm en función de cada paso de purificación y funcionalización. Las AgNPs permanecieron coloidalmente estables después de la purificación y la funcionalización con PVP (PVP-100nmAgNPs).

Las citrato-45nmTiO₂NPs fueron preparadas a partir de nanoparticulas comerciales de TiO₂ de un diámetro de 45 nm en polvo (Sigma-Aldrich, código de producto: 634662). Previo a su uso, las TiO₂NPs se estabilizaron con citrato trisódico dehidratado (Sigma-Aldrich) en un ratio TiO₂:citrato de 1:1.5 wt y dispersado usando un punta de ultrasonidos (40 min con ciclos de 30 s de pulso y 5 s sin pulso con una amplitud de 70%). La concentración final de la stock fue de 1 g/L. El tamaño primario de las partículas fue caracterizado por microscopia electronica de transmission (TEM), obteniendo 96 ± 25 nm for PVP-100nmAgNPs y 46 ± 11 nm for citrato-45nmTiO₂NPs (Figura 2).

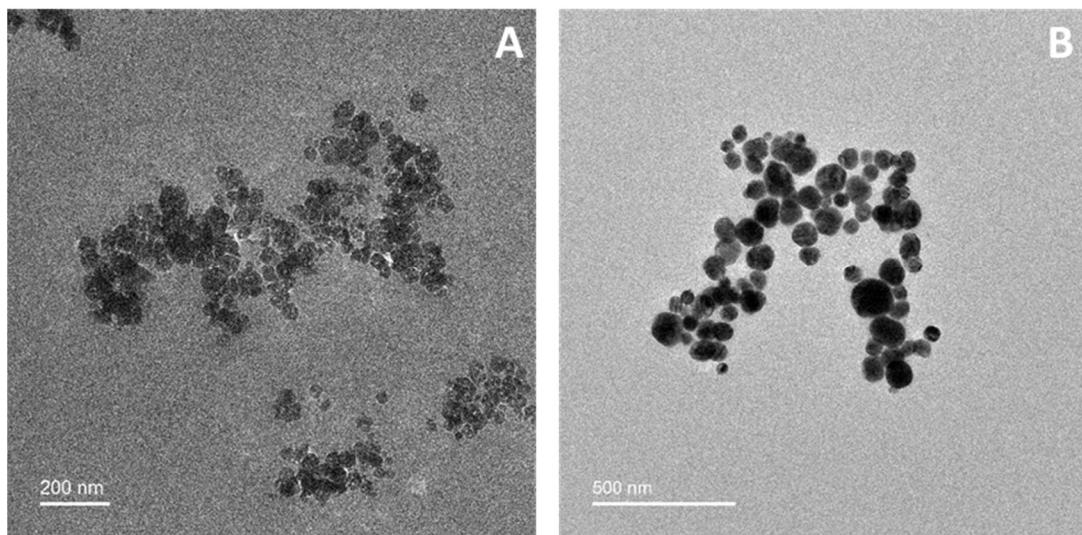


Figura 2. Imágenes de TEM representativas de las partículas seleccionadas: (A) Citrato-45nmTiO₂NPs y (B) PVP-100nmAgNPs.

Para el análisis de la transformación de las NPs, dispersiones de las NPs se prepararon en agua de mar artificial y agua ultrapura (control) con una concentración de 50 mg/L. Las condiciones se resumen en la Tabla 1.

Table 1. Samples prepared for the study

Media	Volumen (L)	PVP-100nmAgNPs (mg/L)	citrato-45nmTiO ₂ NPs (mg/L)
Agua ultrapura	0.5	50	
Agua de mar artificial	0.5	50	
Agua ultrapura	0.5		50
Agua de mar artificial	0.5		50

b. DLS y el zeta potencial

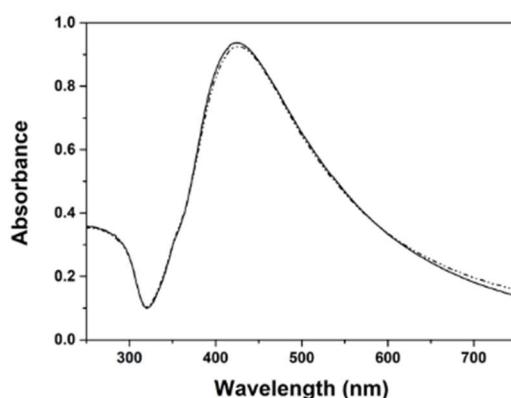
El tamaño hidrodinámico fue medido por DLS (SZ-100 device, Horiba) con un ángulo de dispersión de 173 ° y a una temperatura de 19 °C. Cinco funciones de correlación independientes fueron adquiridas por 60 s. La carga superficial fue medida a 19 °C usando un analizador de zeta potencial. La aproximación de Smoluchowski se ajustó a cinco medidas de la movilidad electroforética, estimando la media y la desviación estándar.

c. Espectroscopia UV-Vis

Los espectros de extinción fue adquirido a 19 C en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2550 (rango de longitud de ondas: 200 – 800 nm) usando cubetas de cuarzo con un paso óptico de 10 mm. La evolución de la transformación de las partículas fue seguida por 7 días.

3. Resultados

Las AgNPs tienen propiedades ópticas únicas, lo cual resulta en un espectro UV-Vis muy partículas en el rango del visible, por eso presenta ese color amarillo característico de las dispersiones de AgNPs. Este espectro es dependiente del tamaño, la forma y la agregación. La Figura 3 muestra los espectros UV-vis de las PVP-100nmAgNPs dispersadas en agua ultrapura y agua de mar artificial. En ambos casos las partículas muestran una única banda centrada a 425 nm, lo cual demuestra que estas partículas son estables coloidalmente en medios con alta fuerza iónica por lo menos 28 días (Figura 4^a). Esta estabilidad es debida a la presencia del PVP ya que este polímero estabiliza las partículas por repulsiones electroestáticas.²



² Moore, T.L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Pe-tri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. Chem. Soc. Rev. 2015, 44, 6287–6305, doi:10.1039/c4cs00487f.

Figure 3. Espectros de extinción de las AgNPs dispersadas en agua ultrapura (línea continua) y agua de mar artificial (línea discontinua).

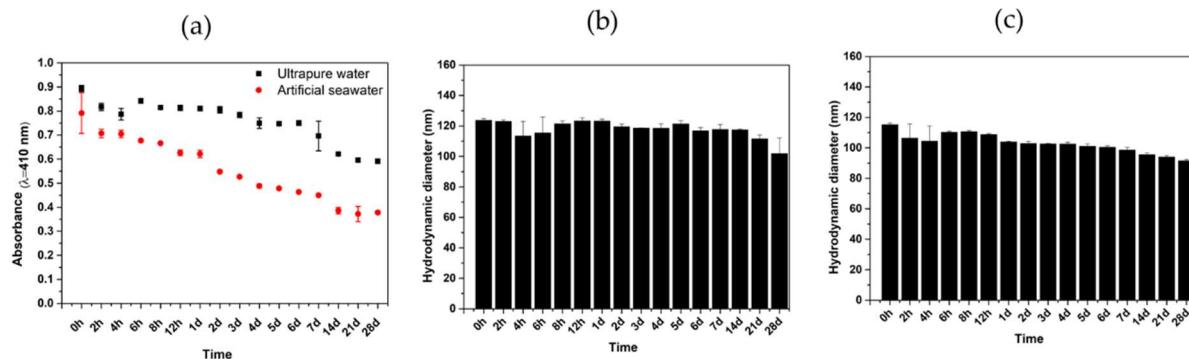


Figure 4. (a) Evolución spectral de la extinción óptica (longitud de onda a 410 nm) y del tamaño hidrodinámico las PVP-100nmAgNPs dispersadas in agua ultrapura (b) y agua de mar artificial (c) seguida por 30 días a 20 °C. Las partículas fueron estable a la agregación, sin embargo un ligero decaimiento de la extinción lo cual se debió a la sedimentación por el tamaño de las partículas.

Debido a que el polímero alrededor de las partículas puede actuar como un espaciador dieléctrico y puede ser un aislador efectivo pudiendo evitar la interacción directa del núcleo de las partículas y por tanto no ver efecto en el espectro UV-Vis de las partículas de plata.³ Las medidas de DLS permite superar este obstáculo y por ello la evolución del tamaño hidrodinámico de la AgNPs fue analizada. PVP-100nmAgNPs presentaron un tamaño hidrodinámico medio de 139 ± 2 nm en agua ultrapura y 97 ± 1 nm en agua de mar artificial durante al menos 28 días (Figura 4), demostrando que las partículas no sufren agregación y confirmando los resultados obtenidos por UV-Vis.

En el caso de las partículas de TiO₂NPs, éstas presetaron un tamaño de 173.6 ± 55.8 nm en agua ultrapura y conservaron su estabilidad en este medio por 7 días. Sin embargo, cuando estas partículas se dispersaron en agua de mar artificial se agregaron inmediatamente alcanzadoun tamaño de 5707.7 ± 1012 nm (Tabla 2). Debido a dicha agregación, las partículas sedimentaron casi por completo después de 1 día (Figura 5).

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de las partículas

	<i>Ultrapure water</i>		<i>Artificial seawater</i>	
	PVP-100nmAg NPs	Citratato-45nmTiO ₂ NPs	PVP-100nmAg NPs	Citratato-45nmTiO ₂ NPs
Hydrodynamic diameter¹ (nm)	139 ± 2	173.6 ± 55.8	97 ± 1	5707.7 ± 1012
PDI² (%)	20 ± 2	0.5 ± 0.2	27 ± 4	3 ± 0.8
Z potential³ (mV)	-21 ± 12	-49 ± 1	-6 ± 10	-3 ± 4

¹ La media del diametro hidrodinámico y el índice de polidispersidad² obtenidaos por DLS a un ángulo de dispersion de 173 °. Las medidas de DLS se realizaron por quintuplicado (media ± desviación estandar (SD)).

² El potential Zeta se midió por quiotuplicado (media ± SD).

³ Vanderkooy, A.; Chen, Y.; Gonzaga, F.; Brook, M.A. Silica Shell/Gold Core Nanoparticles: Correlating Shell Thickness with the Plasmonic Red Shift upon Aggregation. ACS Appl. Mater. Interfaces 2011, 3, 3942–3947, doi:10.1021/am200825f.

Las medidas del potencial zeta revelaron una carga superficial negativa cuando las partículas tanto de AgNPs como de TiO₂NPs dispersadas en agua ultrapure, confirmando la repulsión entre partículas cargadas similares en la dispersión y evitando la agregación (Tabla 2). Sin embargo, ambas partículas dispersadas en agua de mar artificial mostró una disminución en la carga superficial neta. Esta disminución probablemente es debida a la compresión de la doble capa eléctrica (EDL) promovida por la presencia de una alta fuerza iónica en el agua de mar. Esta compresión de la EDL induce agregación cuando solo hay fuerza de repulsión electrostática como es en el caso de las partículas de TiO₂. Sin embargo, en el caso de las partículas AgNPs las repulsiones estéricas se mantienen debido a la presencia del PVP propiciando que las AgNPs permanezcan estables.

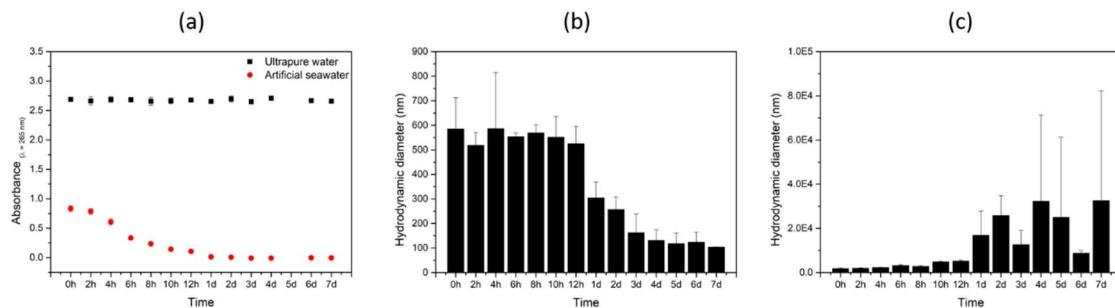
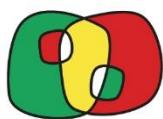


Figure 5. (a) Evolución spectral (longitude de onda a 265 nm) y del tamaño hidrodinámico de las citrato-45nm TiO₂NPs dispersadas in agua ultrapura (b) y agua de mar artificial (c) seguida por 7 días a 20 °C.

4. Conclusiones

Las transformaciones sufridas por las NPs en el agua de mar artificial son dependiente de la composición del núcleo y el tipo de estabilizante que recubre el núcleo. En el caso de las AgNPs fueron coloidalmente estables en contra de la agregación ya que está estabilizado por un polímero, el cual le ofrece una estabilidad contra la gran fuerza iónica del medio por las fuerzas de electrorepulsión que ofrece dicho polímero. En el caso de las partículas TiO₂, la agregación fue inmediata ya que el citrato sólo ofrece estabilidad electroestática.



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



Informes de progreso sobre la detección de nanopartículas

Actividad 4 – Acción 1 – Entregable E 2

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
1. Objetivo del Entregable E2	3
2. Estrategias para la detección de AgNPs y TiO ₂ NPs.....	3
a. Espectroscopia de dispersión Raman aumentada por superficie (SERS) como técnica analítica de detección.....	3
b. Estrategia basada en SERS para detección de AgNPs.	4
c. Estrategia basada en SERS para la detección de TiO ₂ NPs	5
3. Diseño y fabricación de cartuchos de microfluidica.....	7
4. Conclusiones.....	9

1. Objetivo del Entregable E2

El objetivo global del entregable es recoger la información sobre los diseños y fabricación de las plataformas sensóricas para la detección de nanopartículas de plata (AgNPs) y dióxido de titanio (TiO₂NPs) en agua de mar.

2. Estrategias para la detección de AgNPs y TiO₂NPs.

a. Espectroscopia de dispersión Raman aumentada por superficie (SERS) como técnica analítica de detección.

La técnica de detección seleccionada para nuestro objetivo es la espectroscopia de dispersión Raman aumentada por superficie (Surface-enhanced Raman scattering, SERS). SERS es una técnica espectroscópica que combina la espectroscopia láser con las propiedades ópticas (plasmones localizados) características de las nanoestructuras metálicas (las más habituales: oro y plata). Esta interacción laser-plasmón resulta en un enaltecimiento de la señal Raman de los sistemas moleculares cercanos a las nanoestructuras que puede llegar a incrementos de hasta 14 órdenes de magnitud respecto a la señal obtenida mediante dispersión Raman convencional. Debido a que el espectro obtenido es esencialmente un espectro vibracional y, por tanto, contiene toda la información del sistema molecular estudiado, la espectroscopia SERS combina límites de detección ultrabajos, con capacidad de detección de una sola molécula,¹ y además nos ofrece la posibilidad de elucidación estructural y de reactividad de los sistemas moleculares bajo estudio. Esta espectroscopia es por tanto una técnica versátil que permite su aplicación analítica en la detección de partículas inorgánicas en medios acuáticos seleccionando la molécula adecuada como etiqueta Raman y la nanoestructura plásmonica adecuada.

En este caso se seleccionaron nanopartículas de oro en forma de estrella, llamadas nanoestrellas de oro (GNSs), como sustrato activo en SERS. Su selección es debida a que GNSs se comportan como “hot spots” individuales ya que el campo cercano está focalizado en las puntas. Esta focalización ofrece la posibilidad de tener un factor de aumento de la señal Raman de 10^{10} .² Además, dichas NPs permitirán el uso de un láser en el infrarrojo cercano (785 nm), el cual tendrá menos interferencias provenientes de la absorción en el visible de materia orgánica en el agua de mar (Figura 1).

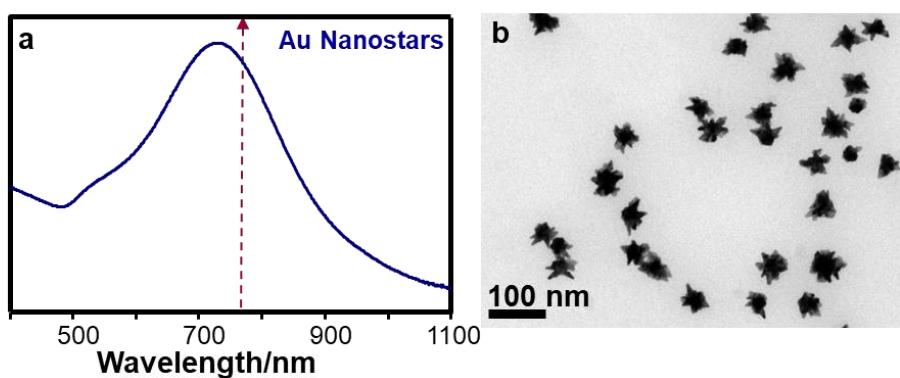


Figure 1. (a) Espectro de absorbancia de GNSs en agua y (b) representativa micrografía de TEM de las mismas.

¹ Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Physical Review Letters* 1997, 78, 1667-1670.

² Rodriguez-Lorenzo, L., Alvarez-Puebla, R. A., Pastoriza-Santos, I., Mazzucco, S., Stephan, O., Kociak, M., de Abajo, F. J. G. (2009). Zeptomol Detection Through Controlled Ultrasensitive Surface-Enhanced Raman Scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 131(13), 4616. doi:10.1021/ja809418t

Para mejorar la reproducibilidad así como la estabilidad coloidal de las GNSs en agua de mar (la cual presenta una alta fuerza iónica debido a la concentración de sales que presenta), las GNSs fueron soportadas en nanocables de titanato sódico (TiNWs) (Figure 2). Tanto la síntesis de GNSs y TiNWs así como la preparación del sistema híbrido han sido publicado previamente por miembros del INL y UVigo.^{2,3}

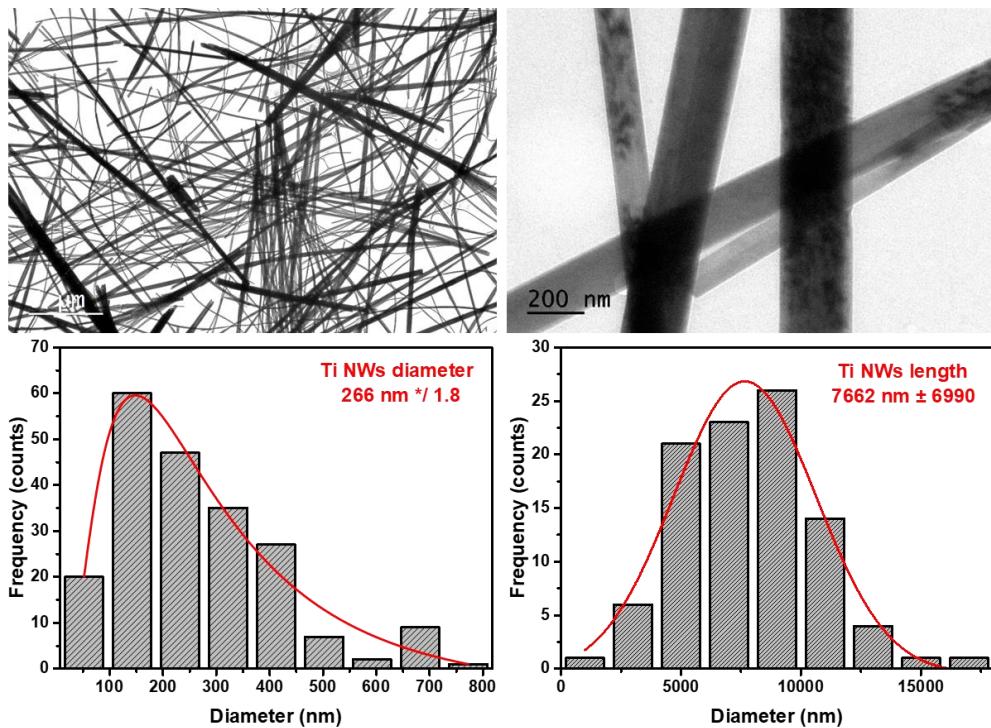


Figure 2. Imágenes representativas de TEM de los nanocables de titanato usados en ambas plataformas sensóricas. Histogramas tanto del diámetro como de la longitud relativa a dichos titanatos.

b. Estrategia basada en SERS para detección de AgNPs.

La estrategia para la detección basada en SERS de AgNPs fue publicada en el marco del proyecto ACUINANO en el año 2021.⁴ Dicha estrategia se basa en una detección indirecta de las AgNPs en agua de mar. En este caso se utiliza una etiqueta Raman, 4-aminobencenotiol (4ABT), acoplada covalentemente a las GNSs por un enlace Au-S. 4ABT fue seleccionada debido a que ha sido extensamente estudiado su espectro SERS tanto en contacto con NPs de oro y plata así como en la formación de dímeros, permitiendo entender los cambios espectrales y así poder correlacionarlos con la presencia de AgNPs. Dicha etiqueta cuando se irradia con una laser 785 nm genera un espectro SERS (Figura 3, espectro rojo) al estar enlazada covalentemente al sustrato SERS, es decir GNSs, con una intensidad relativa a la concentración de 4ABT y el aumento de señal debido GNSs. Dicho espectro variará en presencia de AgNPs ya que estas NPs tienen también un efecto plásmonico y provocarán un

³ Negrín-Montecelo, Y., Testa-Anta, M., Marin-Caba, L., Pérez-Lorenzo, M., Salgueiríño, V., Correa-Duarte, M.A., Comesaña-Hermo, M. (2019). Titanate Nanowires as One-Dimensional Hot Spot Generators for Broadband Au-TiO₂ Photocatalysis. *Nanomaterials*, 9(7), 990; <https://doi.org/10.3390/nano9070990>

⁴ Quarato, M., Pinheiro, I., Vieira, A., Espina, B., & Rodriguez-Lorenzo, L. (2021). Detection of Silver Nanoparticles in Seawater Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Nanomaterials*, 11(7). doi: ARTN 1711 10.3390/nano11071711

aumento de señal SERS que se podrá correlacionar con la concentración de AgNPs (Figure 2, espectro verde), permitiendo no solo la detección sino la cuantificación de AgNPs en agua de mar.

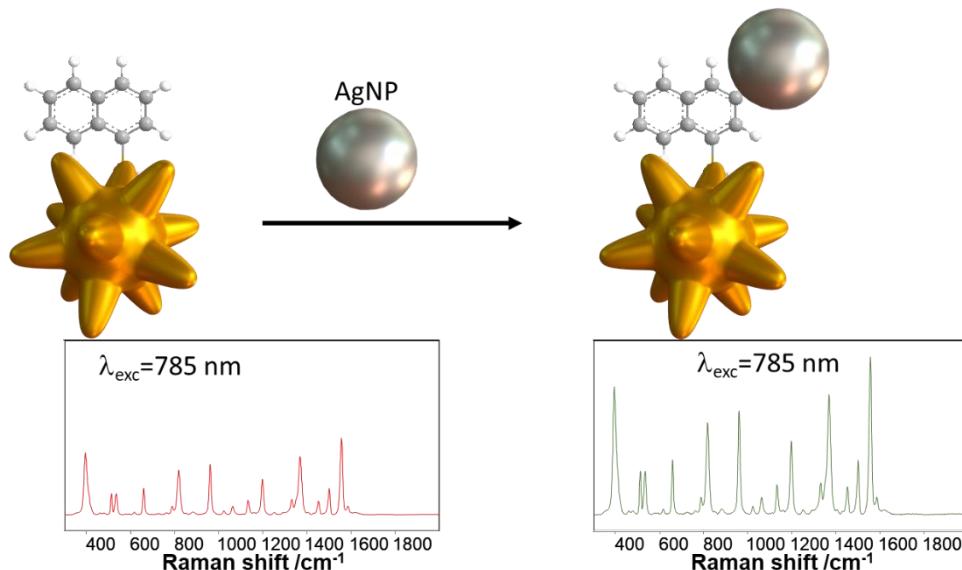


Figura 3. Esquema sobre la estrategia de SERS detección del AgNPs basado en sus propiedades plasmónica. El la “etiqueta” Raman seleccionada dará una señal SERS (espectro rojo) que variará en presencia de AgNPs, en ese caso la señal aumentará (espectro verde).

c. Estrategia basada en SERS para la detección de TiO₂NPs

En el caso de TiO₂NPs, su detección también va a ser indirecta a través de la variación del espectro SERS de un colorante debido a la fotodegradación de este colorante en presencia del TiO₂NPs. En la Figura 4 se muestra un esquema de la estrategia a seguir: el colorante seleccionado es adsorbido en las GNSs generando un espectro SERS cuando se excita con un láser 785 nm (Figura 4, espectro rojo). Dicho espectro no tendrá variación hasta que entre en contacto con las TiO₂NPs y sea irradiado por luz con las longitudes de onda adecuada para que se produzca la degradación en presencia del TiO₂NPs. Cuando ocurra la fotodegradación se observará una disminución de la intensidad del espectro SERS generado por el colorante (Figura 4, espectro verde). En el caso de sólo hubiera TiO₂NPs y el colorante, no se podrá acquirir ningún espectro SERS por la falta de un sustrato activo en dicha técnica, es decir GNSs.

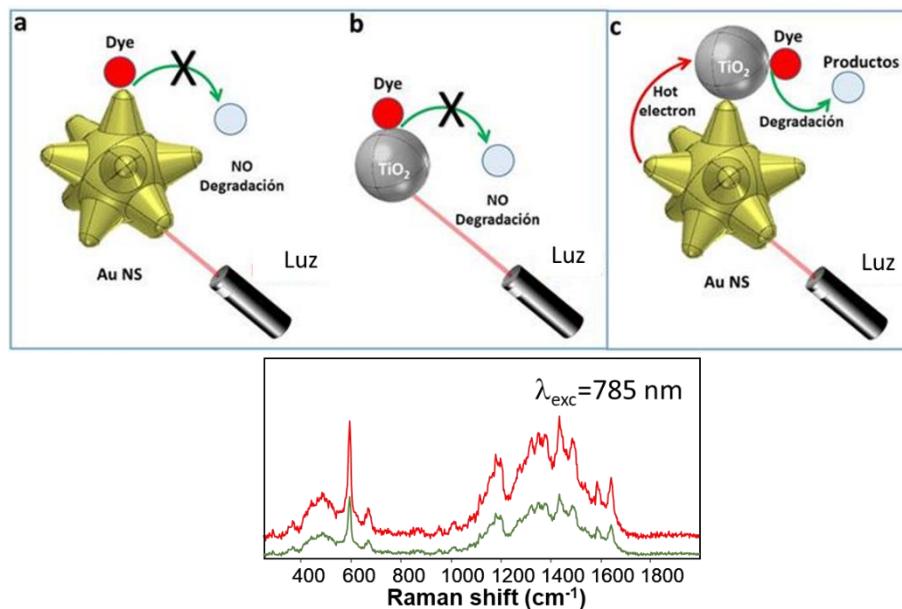


Figura 4. Esquema sobre la estrategia de SERS detección del TiO₂NPs basado en sus propiedades fotocatalíticas. El colorante seleccionada dará una señal SERS (espectro rojo) que variará en presencia de TiO₂NPs y después de ser irradiada con la fuente de luz adecuada, en ese caso la señal disminuirá (espectro verde).

Como en el caso de la estrategia para detectar AgNPs, las GNSs fueron soportadas en TiNWs. Sin embargo, en este caso la concentración del nanoestrellas de oro fue ajustada para generar el efecto SERS sin tener un efecto negativo en las propiedades fotocatalíticas de las partículas de TiO₂NPs. La Figura 5 muestra como una concentración elevada de GNSs (0.2 mM, línea verde de la Figura 5 d) ofrece el mismo resultado que añadiendo una concentración baja de GNSs (0.08 mM) o en ausencia de GNSs. En esta misma figura se observa que la concentración óptima de GNSs es 0.1 mM.

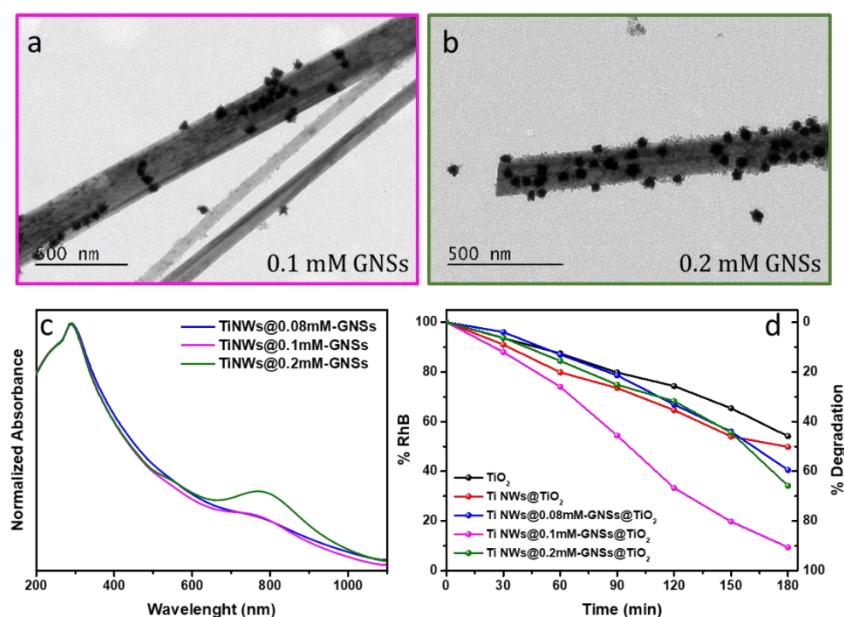


Figura 5. Imágenes de TEM representativas de (a) 0.1 mM y (b) 0.2 mM de GNSs soportadas en TiNWs. (c) Espectros de absorbancia de TiNWs@GNSs con diferentes concentraciones de GNSs. (d) Fotodegradación de rhodamina B usando sólo TiO₂NPs, TiO₂NPs soportados en TiNWs y TiO₂NPs soportados en TiNWs@GNSs.

Se seleccionó azul de metileno (MB) como sustrato de fotodegradación en vez de Rodamina B (RhB), la cual es fotodegradada con mayor eficacia por las partículas de TiO₂ (LoD reportados usando absorbancia para el azul de metileno (MB) es de 5 ppm, mientras que para RhB se obtuvo 1 ppm), debido a que la señal SERS proporcionada por el azul de metileno es mayor (Figura 6).

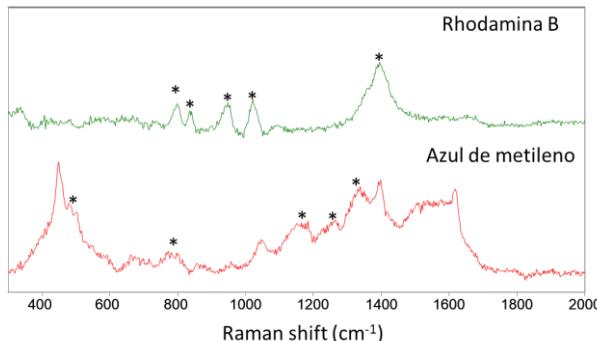


Figure 6. Espectros SERS obtenidos para RhB y MB usando GNSs soportados por TiNWs. Las bandas que están marcadas por asteriscos no son relativas al colorante y provienen del sustrato. En el caso de RhB, ninguna banda relativa a dicho colorante fue detectada.

3. Diseño y fabricación de cartuchos de microfluidica

Para mejorar la portabilidad de la plataforma sensórica, INL diseño y fabricó cartuchos de microfluidica en los cuales los sustratos activos en SERS pueden ser integrados.

Tanto el cartucho para la detección de AgNPs como el usado para la detección de TiO₂NPs están constituidos de dos partes cuadradas de acrílico (PMMA) (Figura 7). La parte inferior fue diseñada para soportar una membrana de nylon para usarla como soporte del sustrato SERS y además la salida de líquido está localizada debajo de esta membrana funcionando como un sistema de filtraje. La parte superior contiene el área de detección la cual fue cerrada con vidrio para ser transparente al láser y tener la mínima absorción de luz por el material que usamos en el área de detección. El área de detección diseñada para AgNPs fue más pequeña (0.5 cm) que en el caso de TiO₂NPs (1.3 cm) (Figure 7). Además esta parte superior contiene una entrada y una salida. Juntas tóricas hechas con polidimetilsiloxano (PDMS) se usaron para asegurar un sellado del sistema. Ambas partes se ensamblan utilizando tornillos.

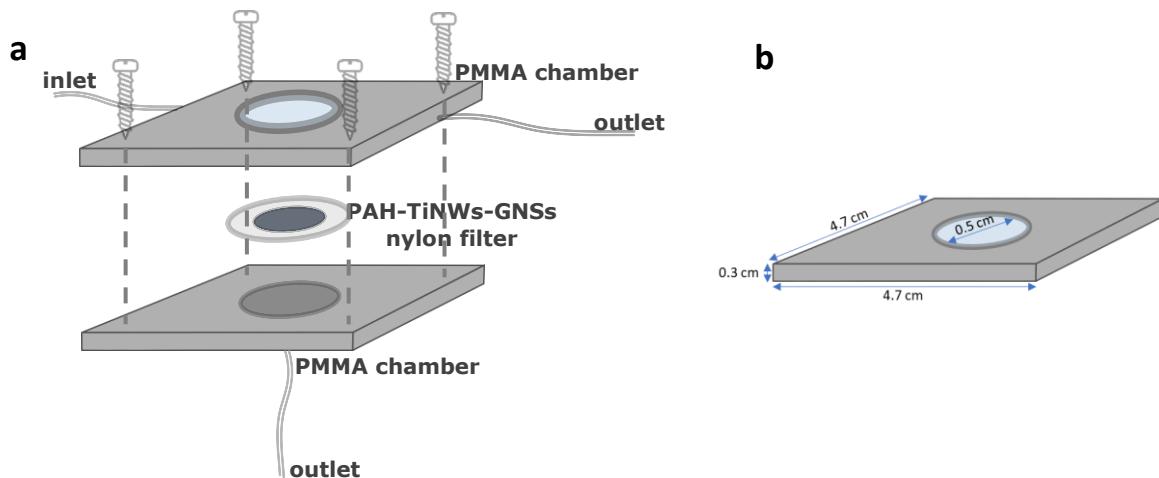


Figure 7. Esquema del cartucho fabricado en INL. El diámetro del área de detección presentado en (b) es diferente dependiendo que NP es detectada: para AgNPs el diámetro es 0.5 cm; sin embargo en el caso de TiO₂NPs el diámetro es de 1.3 cm.

La integración del sustrato SERS se realiza *in situ*, es decir, el sustrato fue inyectado y soportado en la membrana de nylon utilizando la salida colocada en la parte inferior y la salida localizada en la parte superior fue cerrada. Para garantizar un flujo constante, una bomba de jeringa fue utilizada (Figure 8). En ambos casos, el sustrato SERS fue funcionalizado ya sea con 4ABT (sección 2b) para la detección de AgNPs o azul de metileno (sección 2c) para la detección de TiO₂NPs.

En el caso específico de la detección de TiO₂NPs, se diseñó un sistema de iluminación con 4 LEDs del tamaño del área de detección (1.3 cm; Figura 8). Dicho sistema de LEDs fue utilizado como fuente de luz para realizar la fotodegradación en presencia de TiO₂NPs del azul de metileno.



Figure 8. (a) El cartucho de microfluïca se conectó a una bomba de jeringa donde la muestra que contenga las NPs se colocó en una jeringa. (b) and (c) muestran la placa electrónica para controlar un sistema de 4 LEDs fabricado en INL. La longitud de onda de dichos LEDs es 365 nm.

Para la detección se utilizó un sistema Raman portátil el cual consta de un espectómetro, un laser 785 nm y una sonda Raman. El control de la potencia del laser, el tiempo de adquisición, el encendido/apagado de los LEDs se realiza utilizando un portátil (Figure 9). En ambos caso el cartucho de microfluidica fue colocado en un plataforma donde la sonda de Raman está integrada para poder realizar una optimización de la señal SERS adquirida en el sistema (Figure 9).



Figure 9. Esquema de la configuración de un sistema Raman portátil. La imagen de la derecha muestra como se integra un cartucho de microfluidica con la fibra óptica del Raman.

4. Conclusiones

Hemos establecido estrategias basadas en SERS para la detección tanto de AgNPs como de TiO₂NPs. Para poder establecer estas estrategias en un dispositivo portátil, cartuchos de microfluidica fueron diseñados y fabricados en el INL. Los sustratos SERS (GNSs soportados en TiNWs) se integraron en dichos dispositivos portátiles para a su vez integrarlos con un Raman portátil con configuración de fibra óptica (sonda Raman). Con todos los componentes presentados en este entregable desarrollamos plataformas sensóricas capaces de generar datos sobre la presencia y cantidad de AgNPs o TiO₂NPs en medios acuosos.



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



Informe técnico sobre la detección de las nanopartículas en aguas y su detección

Actividad 4 – Acción 1 – Entregable E 3

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
1. Objetivo del Entregable E3	3
2. Evaluación del desempeño de la plataforma sensórica para la detección de nanopartículas de plata (AgNPs)	3
3. Evaluación del desempeño de la plataforma sensórica para la detección de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO ₂ NPs)	5
4. Conclusiones.....	6

1. Objetivo del Entregable E3

El objetivo global del entregable fue la evaluación del desempeño de las plataformas sensóricas para la detección de nanopartículas de plata (AgNPs) y dióxido de titanio (TiO₂NPs) en agua de mar.

2. Evaluación del desempeño de la plataforma sensórica para la detección de nanopartículas de plata (AgNPs)

La estrategia para la detección basada en SERS de AgNPs fue publicada en el marco del proyecto ACUINANO en el año 2021.¹ Dicha estrategia se basa en una detección indirecta de las AgNPs en agua de mar. En este caso se utiliza una etiqueta Raman, 4-aminobencenothiol (4ABT), acoplada covalentemente a las GNSs por un enlace Au-S. 4ABT fue seleccionada debido a que ha sido extensamente estudiado su espectro SERS tanto en contacto con NPs de oro y plata así como en la formación de dímeros, permitiendo entender los cambios espectrales y así poder correlacionarlos con la presencia de AgNPs. Dicha etiqueta cuando se irradia con una laser 785 nm genera un espectro SERS al estar enlazada covalentemente al sustrato SERS, es decir GNSs, con una intensidad relativa a la concentración de 4ABT y el aumento de señal debido GNSs. Dicho espectro variará en presencia de AgNPs ya que estas NPs tienen también un efecto plásmonico y provocarán un aumento de señal SERS que se podrá correlacionar con la concentración de AgNPs, permitiendo no solo la detección sino la cuantificación de AgNPs en agua de mar.

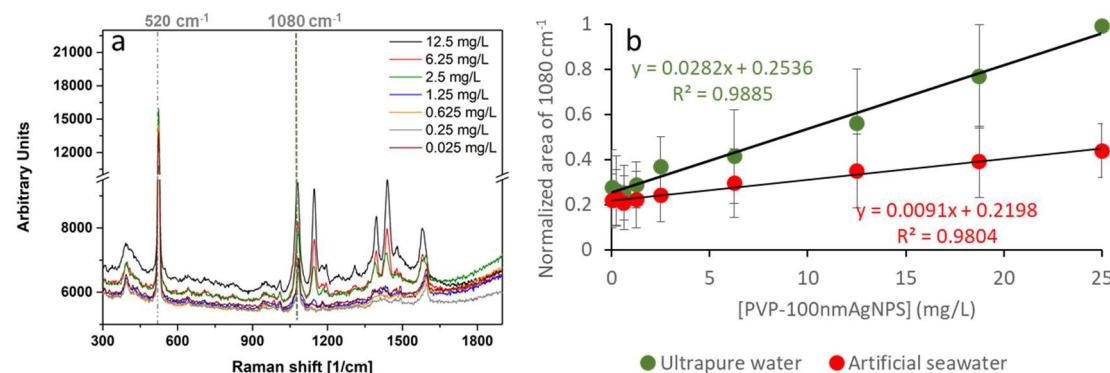


Figura 1. Análisis SERS de las PVP-100nm AgNPs dispersadas tanto en agua ultrapura como en agua de mar artificial. (a) Representativos espectros SERS obtenidos a diferentes concentraciones de PVP-100nm AgNPs en agua de mar artificial. La línea verde punteada muestra el pico de 4ABT seleccionado (1080 cm^{-1}) para construir el calibrado en b, mientras que la línea puntuada gris muestra el pico característico del silicio (520 cm^{-1}), el cual se utilizó para normalizar la señal SERS. (b) Curvas de calibrado determinadas experimentalmente para la detección de dichas AgNPs en agua ultrapura (puntos verdes) y agua de mar artificial (puntos rojos). Una relación lineal entre la concentración de AgNPs y la señal SERS normalizada fue encontrada en el rango de 25 – 0.025 mg/L.

La detección se realizó en primer lugar en líquido, añadiendo diferentes concentraciones de PVP-100nm AgNPs (partícula seleccionada, ver Entregable E1) a una concentración constante de 4ABT-GNSs. En la Figura 1a se muestran los espectros SERS obtenidos a diferentes concentraciones de AgNPs en agua de mar artificial usando un Raman portátil con un láser de excitación 785 nm (ver Entregable E2). En la Figura 1b se muestra el calibrado obtenido tanto en agua ultrapura (puntos verdes en Figura 1) y

¹ Quarato, M., Pinheiro, I., Vieira, A., Espina, B., & Rodriguez-Lorenzo, L. (2021). Detection of Silver Nanoparticles in Seawater Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Nanomaterials*, 11(7). doi: ARTN 1711 10.3390/nano11071711

en agua de mar artificial (puntos rojos en Figura 1). Para disminuir la posible variabilidad de la señal SERS del 4ABT, el pico seleccionado 1080 cm^{-1} de 4ABT fue normalizado usando el pico característico del silicio (520 cm^{-1}), obteniendo un rango lineal entre la concentración de AgNPs y la señal SERS normalizada entre $25 - 0.025\text{ mg/L}$ en ambos medios (agua ultrapura y agua de mar artificial).

El límite de detección (LoD) y de cuantificación (LoQ) fue calculado utilizando la curva de calibrado aparte de las ecuaciones: $3.3SDy/a$ and $10Dy/a$, respectivamente, donde SDy es la desviación estándar de la respuesta de la curva y a es la pendiente de la curva de calibrado. Por tanto, los valores obtenidos fueron:

	Agua ultrapura	Agua de mar artificial
LoD (mg/L)	2.3 ± 1.5	1.5 ± 0.7
LoQ (mg/L)	7.0 ± 4.6	4.6 ± 2.1

Dichos LoD y LoQ están lejos de los valores deseados, ya que la concentración predicha de AgNPs en agua de relevancia medioambiental está en el rango de ng/L. Así, para mejorar LoD y LoQ así como la portabilidad de la plataforma sensórica, INL diseño y fabricó cartuchos de microfluidica en los cuales los sustratos activos en SERS pueden ser integrados (ver detalles en el Entregable 2). En la Figura 2 se muestra un esquema del sistema de inyección así como imágenes del cartucho.

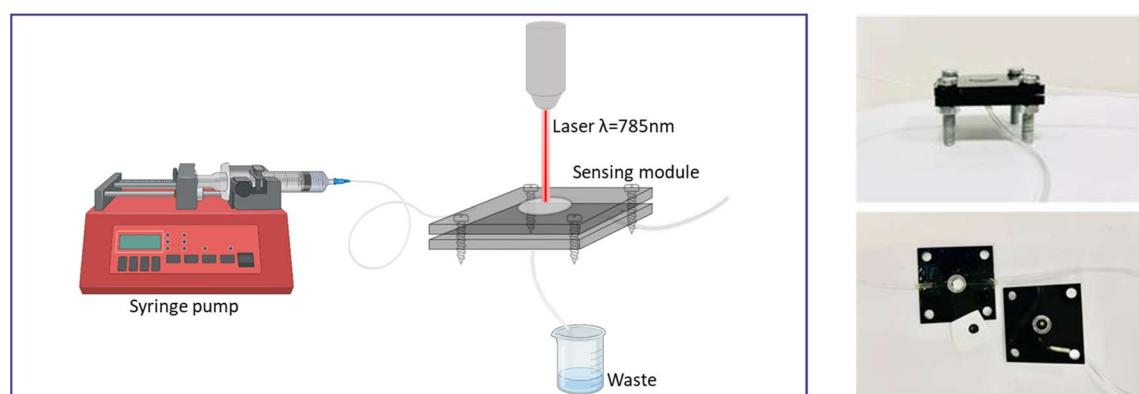


Figura 2. Esquema del sistema para detectar AgNPs: la muestra se inyecta en el cartucho usando una bomba de jeringa para controlar la velocidad de inyección ($100\text{ }\mu\text{g/min}$). El flujo es perpendicular a la cámara de detección (la zona transparente del cartucho). El láser acoplado al sistema Raman se alinea y enfoca a la cámara de detección para obtener la señal SERS óptima.

En este caso, se evaluó el desempeño de la plataforma sensórica en agua de mar artificial y en agua de mar que contiene materia orgánica (es decir, agua de mar usada para cultivar mejillones en tanques). Para validar las concentraciones que usamos para el calibrado, usamos dos técnicas: análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y Detección Individual de Partículas mediante Plasma de Acoplamiento Inductivo con Detección por Espectrometría de Masas (sp-ICP-MS). En la Figura 3 se muestra la comparación de la concentración determinada en las diferentes técnicas y la teórica determinada. Lo más importante que hay que tener en cuenta es que NTA es más fiable en concentraciones más altas, mientras sp-ICP-MS para concentraciones más bajas evitando un factor de dilución alto que provoca un error mayor en sp-ICP-MS.

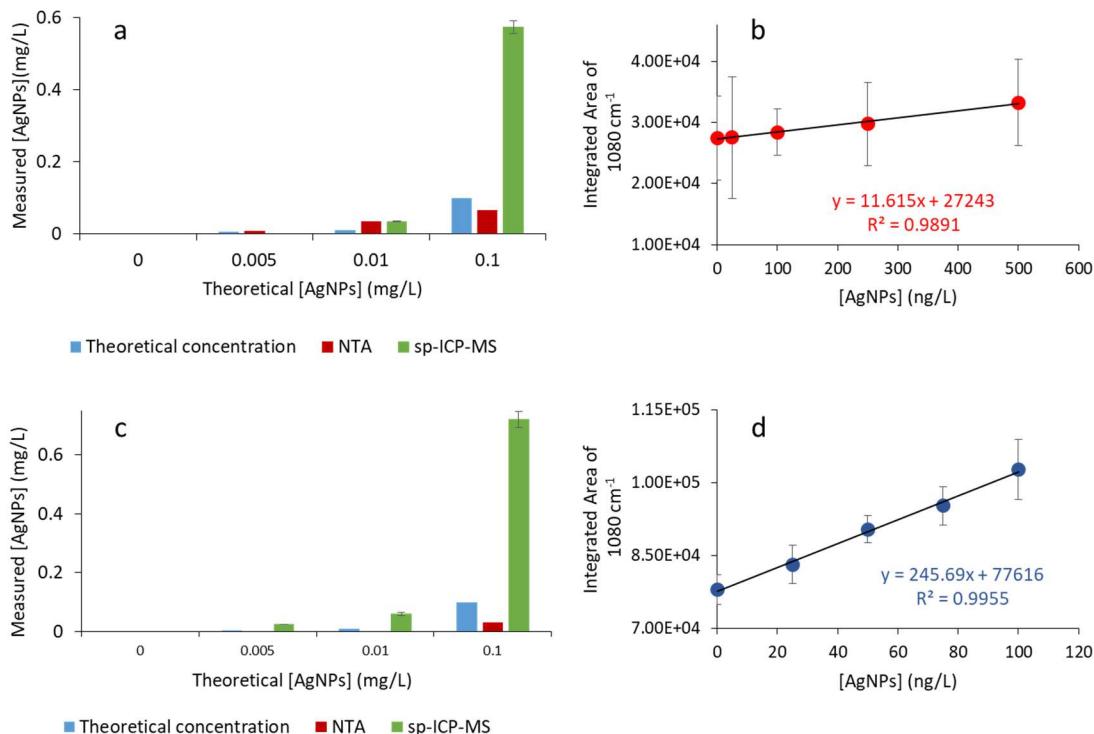


Figura 3. (a, c) Validación de la concentración de AgNPs añadida a (a) agua de mar artificial y (c) agua de mar expuesta a mejillones. (b,d) Curvas de calibrado determinadas experimentalmente para la detección de dichas AgNPs en (b) agua de mar artificial (puntos rojos) y (d) agua de mar expuesto a mejillones (puntos azules). Una relación lineal entre la concentración de AgNPs y la señal SERS fue encontrada en el rango de 500 – 0 ng/L para agua de mar artificial y 100 – 0 ng/L para agua de mar expuesta a mejillones.

Usando el cartucho de microfluidica para la detección de PVP-100nm AgNPs, se observó que hay una relación lineal entre la concentración y la señal SERS en el rango de ng/L (ver Figura3 b and c). En este caso, los LoD y LoQ estimados fueron:

	Agua de mar artificial	Agua de mar artificial expuesto a mejillones
LoD (ng/L)	5.0 ± 3.5	8.9 ± 1.4
LoQ (ng/L)	15.1 ± 10.6	27.0 ± 3.6

Estos valores demuestran que usando el cartucho de microfluidica se alcanza los LoD y LoQ necesarios para la detección de AgNPs en las concentraciones relevantes en agua de mar. Además el método parece ser más sensible en matrices que contiene materia orgánica (Figure 3 d).

3. Evaluación del desempeño de la plataforma sensórica para la detección de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂ NPs)

En el caso de TiO₂NPs, su detección también va a ser indirecta a través de la variación del espectro SERS de un colorante debido a la fotodegradación de este colorante en presencia del TiO₂NPs. En la Figura 4 se muestra un esquema de la estrategia a seguir: el colorante seleccionado es adsorbido en las GNSs generando un espectro SERS cuando se excita con un láser 785 nm. Dicho espectro no tendrá variación hasta que entre en contacto con las TiO₂NPs y sea irradiado por luz con las longitudes de onda adecuada para que se produzca la degradación en presencia del TiO₂NPs. Cuando ocurra la

fotodegradación se observará una disminución de la intensidad del espectro SERS generado por el colorante. En el caso de sólo hubiera TiO₂NPs y el colorante, no se podrá adquirir ningún espectro SERS por la falta de un sustrato activo en dicha técnica, es decir GNSS.

Como se describe en el entregable E2, se exploró el desempeño del cartucho de microfluídica integrado a un sistema de iluminación LED y a un sistema Raman para la detección de TiO₂. En la Figura 4 se muestra el desempeño de la fotodegradación del azul de metileno en presencia de TiO₂NPs en comparación con los controles (condiciones de oscuridad y de luz usando el sistema LED después de 30 min de exposición). La variabilidad de los resultados (observar el error incluido en el gráfica en la Figura 6b) no permitió disminuir la concentración de TiO₂NPs y ver diferencias con el control de luz a menores concentraciones de 100 mg/L.

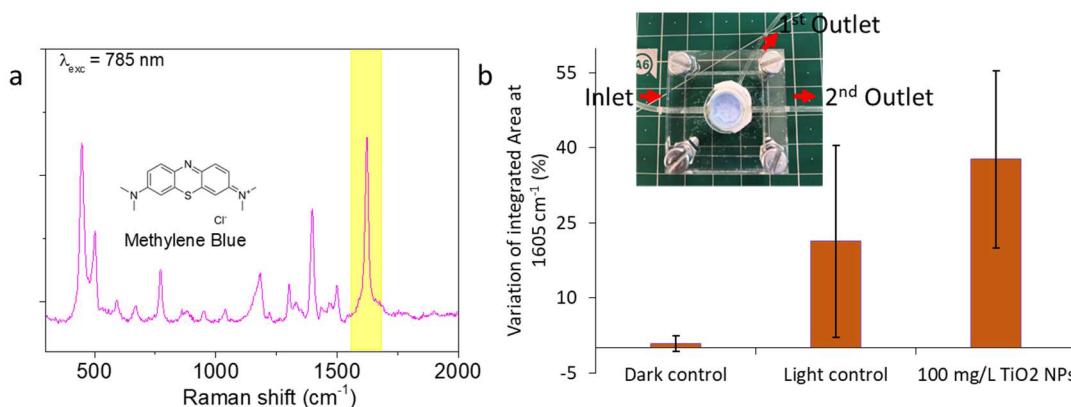


Figure 4. (a) Espectro SERS obtenido para azul de metileno (MB) usando GNSS soportados por TiNWs. (b) Variación del espectro SERS del MB después de ser injectado en el cartucho de microfluídica y expuesto a condiciones de oscuridad (dark control), de luz usando el sistema LED, ver detalles en el entregable E2, (light control) y la fotodegradación en presencia de 100 mg/L de TiO₂ NPs. En los tres casos el tiempo de exposición fue 30 min.

Lo más probable es que hiciera falta una mayor potencia del sistema de iluminación para conseguir mayor sensibilidad del sistema. En vez de usar un sistema de iluminación de 4 LEDs con una longitud de onda 365 nm, se debería explorar el uso de un simulador solar (lámpara de Xeon) con una configuración de fibra óptica para iluminar sólo el área de interés del cartucho de microfluídica.

4. Conclusiones

Hemos evaluado el desempeño de las plataformas sensóricas desarrolladas y fabricadas en el proyecto. La plataforma desarrollada para la detección de AgNPs ofreció buenos resultados permitiendo la generación de curvas de calibrados en un rango dinámico de 0 – 500 ng/L para agua de mar artificial y de 0 – 100 ng/L para agua de mar expuesta a mejillones. Los LoD y LoQ obtenidos en ambos medios estuvieron en el rango de ng/L y la sensibilidad del método fue mayor en presencia de materia orgánica (agua de mar expuesta a mejillones). Sin embargo, la plataforma para la detección de TiO₂ NPs no presentó un buen desempeño. Hubo gran variabilidad, lo cual no permitió generar ninguna curva de calibrado ni datos analíticos fiables. La hipótesis de la razón de ello es que el sistema de iluminación LEDs no ofreció la suficiente potencia para generar una fotodegradación por TiO₂ reproducible.

Article

Detection of Silver Nanoparticles in Seawater Using Surface-Enhanced Raman Scattering

Monica Quarato, Ivone Pinheiro, Ana Vieira, Begoña Espiña  and Laura Rodriguez-Lorenzo  *

International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL), Avda Mestre José Veiga, 4715-310 Braga, Portugal;
monica.quarato@inl.int (M.Q.); ivone.pinheiro@inl.int (I.P.); ana.vieira@inl.int (A.V.); Begona.Espina@inl.int (B.E.)
* Correspondence: laura.rodriguez-lorenzo@inl.int

Abstract: Nanomaterials significantly contribute to the development of new solutions to improve consumer products properties. Silver nanoparticles (AgNPs) are one of the most used, and as human exposure to such NPs increases, there is a growing need for analytical methods to identify and quantify nanoparticles present in the environment. Here we designed a detection strategy for AgNPs in seawater using surface-enhanced Raman Scattering (SERS). Three commercial AgNPs coated with polyvinylpyrrolidone (PVP) were used to determine the relative impact of size (PVP-15nmAgNPs and PVP-100nmAgNPs) and aggregation degree (predefined Ag aggregates, PVP-50–80nmAgNPs) on the SERS-based detection method. The study of colloidal stability and dissolution of selected AgNPs into seawater was carried out by dynamic light scattering and UV-vis spectroscopy. We showed that PVP-15nmAgNPs and PVP-100nmAgNPs remained colloidally stable, while PVP-50–80nmAgNPs formed bigger aggregates. We demonstrated that the SERS-based method developed here have the capacity to detect and quantify single and aggregates of AgNPs in seawater. The size had almost no effect on the detection limit (2.15 ± 1.22 mg/L for PVP-15nmAgNPs vs. 1.51 ± 0.71 mg/L for PVP-100nmAgNPs), while aggregation caused an increase of 2.9-fold (6.08 ± 1.21 mg/L). Our results demonstrate the importance of understanding NPs transformation in seawater since this can influence the detection method performance.



Citation: Quarato, M.; Pinheiro, I.; Vieira, A.; Espiña, B.; Rodriguez-Lorenzo, L. Detection of Silver Nanoparticles in Seawater Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1711. <https://doi.org/10.3390/nano11071711>

Academic Editor: Maurizio Muniz-Miranda

Received: 2 June 2021

Accepted: 24 June 2021

Published: 29 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: AgNPs; SERS; NPs transformation; water; sensor

1. Introduction

Nanomaterials [1] are becoming more and more prevalent as ingredients for several consumer products such as paints, personal care products, food, and cosmetics [2–4]. Silver nanoparticles (AgNPs) are becoming, among others, one of the most-used engineered nanomaterials as a result of their properties, mainly their antibacterial properties, in consumer products, including textiles, disinfectants and filtration membranes where the particles can be found in both solid or liquid (coating and spray) state [5]. Despite all the promising applications, there is a growing concern about associated risks to humans and ecosystems. The production, transport, washing, or disposal of products containing AgNPs are only some of the steps that could lead to Ag release into the environment compromising agricultural and fishery activities with a potential impact on human health [6–8]. Therefore, there is a growing need for an analytical method to directly detect these NPs present in the environment.

At present, there are different techniques that allow the detection and quantification of AgNPs, including spectroscopic [9] and electrochemical methods [10,11], and, for the majority, single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS) [12–14]. Although these techniques allow both qualitative and quantitative determination of NPs, it is crucial to develop equally accurate and fast methods for their characterization and environmental risk assessment on-site. The development of portable sensors for their detection is also necessary since those will allow decentralized monitoring and quick implementation of measures for risk mitigation [15].

Taking advantage of the high scattering and plasmonic properties of AgNPs [16,17], specific detection methods based on surface-enhance Raman scattering can be developed. Unlike Raman spectroscopy, SERS overcomes the limitation due to weak signals by exploiting such AgNPs properties via electromagnetic enhancement mechanism to Raman signal increase [18]. This, coupled with chemical interactions between molecular probe and plasmonic NP and with the ability of metal surfaces to quench the fluorescence background when both are in close proximity, makes SERS sensitive enough to detect trace amounts for analysis even at the single molecule level [19]. A non-overlapped spectra with a narrow bandwidth sensitive to slight changes in molecule structures and orientation is the output of this technique [20]. The applicability of SERS in the detection of nanostructures, like AgNPs, has been already reported, in which a Raman reporter molecule, ferbam (ferric dimethyl-dithiocarbamate), allowed the detection of NPs in complex matrices after strong interactions were established [21].

This work aims to design a detection method for AgNPs by correlating the enhancement of SERS signal of 4-aminobenzenethiol (4ABT)-attached to gold nanostars (AuNSs) with the presence of AgNPs in seawater. Seawater was selected as an environmentally relevant medium because coastal waters are one of the main sinks at the end-of-life of AgNPs-containing products, mainly through treated and untreated wastewater discharges [22]. We selected AuNSs as a highly efficient SERS substrate due to the high localization of the electromagnetic field at their tips and their consequent behavior as individual *hot spots* allowing zeptomole detection of molecules attached to their surface [23–25]. 4ABT was chosen as a Raman reporter due to both its aromatic nature that confers a high Raman cross-section and its functional groups, -SH and -NH₂, which strongly interact with Au and Ag. In fact, 4ABT has been already used as a Raman reporter to detect AgNPs in dietary supplement products by SERS via the formation of S-Ag bond [26]. In this work, we carried out a different approach: First, 4ABT was attached to AuNSs and, subsequently, the free amino group of 4ABT was available bind to AgNPs [27]. Thus, the enhancement of the SERS signal can be explained by inter-particles AgNPs-AuNSs interaction via 4ABT generating *hot spots*, which increases the concentration of electromagnetic field at these sites and, as a consequence, the enhancement of SERS signal also occurs [28]. This enhancement depends on the plasmonic properties of AgNPs, which in turn depend on the physicochemical properties of the NPs such as size, shape, aggregation state, and surface coating. To investigate the effect of these parameters, we selected three commercially available AgNPs coated with polyvinylpyrrolidone (PVP). PVP is a widely used water-soluble polymer whose role as stabilizing agent is well known [29,30]. The molar ratio between silver and macromolecule (i.e., polymer) is usually enough to prevent or at least slow down aggregation and dissolution processes over the time [31]. Having similar surface properties due to the presence of PVP, we studied the effect of the size on SERS enhancement by having two AgNPs with a diameter of 15 (PVP-Ag15nm NPs) and 100 nm (PVP-Ag100nm NPs) and the effect of the aggregation including a predefined product formed by Ag aggregates coated with PVP with a primary NP size of 50–80 nm (PVP-Ag50–80 NPs).

We studied the colloidal stability (i.e., aggregation and dissolution) of selected AgNPs in seawater by UV-vis spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), and zeta potential. After understanding the possible transformation of AgNPs in seawater, we performed average SERS detection (i.e., in liquid) in both ultrapure water and seawater to study the possible matrix interference [32] (i.e., salt concentration). In addition, we characterized the AgNPs interaction with 4ABT-coated AuNSs by transmission electron microscopy (TEM) and the colloidal stability of AuNSs in seawater by UV-vis spectroscopy. We were able to construct calibration curves for all AgNPs even the smaller one, PVP-Ag15nm NPs, in seawater. The limits of detection using a portable Raman system, which has lower performance of the detector in comparison with the Raman confocal microscope [33,34], were in the mg/L range.

2. Materials and Methods

2.1. Silver Nanoparticles (AgNPs)

AgNPs powders with a core diameter of 15 nm (PVP-Ag15nm NPs) and 50–80 nm (PVP-Ag50–80nm NPs) were supplied by SSNano (Houston, TX, USA; product code: 0127SH) and US Research Nanomaterials, Inc (Houston, TX, USA; product code: US1018), respectively, and used without any further purification. The powder composition was 25% wt silver and 75% wt polyvinylpyrrolidone (PVP) for PVP-Ag15nm NPs and 0.2% of PVP for PVP-Ag50–80nm NPs. Further, 1 g/L of AgNPs dispersion was prepared in ultrapure water with a resistivity of 18.2 MΩ at 25 °C (Millipore apparatus, MQ Aquantage A10, Merck, Algés, Portugal) and this was sonicated for 15 min using a bath sonicator (Elmasonic P, Elma, VWR, Amadora, Portugal) (37 kHz, 100% at 25 °C). The dispersion was stored at 4 °C until further use.

An AgNPs ink containing 30% wt AgNPs dispersed in ethylene glycol was purchased from Sigma-Aldrich (Merck Life Science-Sigma Aldrich, Algés, Portugal; product code: 798738). In order to remove ethylene glycol due to its toxicity [35], 4 g of the AgNPs ink were diluted with ultrapure water to reach a concentration of ethylene glycol of 0.15–0.3 M (30–15 mL final volume). The diluted ink was then dialyzed using a 12 kDa cellulose membrane (Merck Life Science Sigma-Aldrich, Algés, Portugal), product code: D6191 against ultrapure water for 6 h. After dialysis, AgNPs were mixed with 24 mL of 150 g/L PVP solution, reaching an Ag:PVP ratio of 1:3 wt. The PVP-Ag100nm NPs dispersion was stored at 4 °C until further use. The purification process and PVP coating of these AgNPs were characterized by dynamic light scattering (SZ-100 device, Horiba, ABX SAS, Amadora, Portugal) and UV-vis spectroscopy (Perkin-Elmer LAMBDA 950 spectrophotometer, Scientific Laboratory Supplies, Wilford, Nottingham, UK). The results are shown in Figure S1.

2.2. Synthesis and Functionalization of Gold Nanostars (AuNSs)

The synthesis of AuNSs followed the seed-mediated growth method, in which gold spherical nanoparticles (AuNPs) with a diameter of 13 nm work as seeds for the following star-shaped particles formation.

AuNPs were obtained by in-house synthesis according to the reduction method developed by Turkevich et al. [36] where a small amount of gold salt is reduced by the presence of sodium citrate. Briefly, 250 mL of 0.5 mM of an aqueous solution of HAuCl₄ (Merck Life Science Sigma-Aldrich, Algés, Portugal) was brought to boil for 5–10 min while being kept under vigorous stirring. Then, 12.5 mL of a warm sodium citrate solution (1% wt/V; Merck Life Science, Sigma-Aldrich, Algés, Portugal) was quickly added. The formation of AuNPs was confirmed by the color change of the dispersion from light yellow to dark red.

Once the synthesis was over, the suspension was cooled down until room temperature was reached and kept in the dark at 4 °C until further use.

For the coating, an aqueous solution containing 530 mg of polyvinylpyrrolidone (PVP) with a molecular weight (MW) of 10K (TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium) was prepared and added to the AuNPs solution to provide a ratio of 60 PVP molecules per nm². The reaction was left overnight under magnetic stirring and the PVP excess was then removed, performing a centrifugation step at 7000× g for 90 min. PVP-coated AuNPs were re-dispersed in ethanol and stored in dark condition at 4 °C until further use.

The formation of AuNSs took place by mixing 20 g of PVP-10K with 200 mL of N-dimethylformamide (DMF, Merck Life Science, Sigma-Aldrich, Algés, Portugal) in the presence of 0.5 mM of HAuCl₄ and 0.023 mM of preformed AuNPs seeds. After a 20 min reaction, the solution became dark blue, and 3 cycles of 60 min centrifugation were performed to finally re-disperse the solution in ethanol.

The functionalization occurred by the conjugation of AuNSs with a Raman reporter molecule, 4-aminobenzenthiol (4-ABT; Merck Life Science, Sigma-Aldrich, Algés, Portugal),

using 1:1 molar ratio. If freshly prepared, the reaction took place in 10 min, followed by 3 centrifugation steps in order to remove the molecules excess ($3300 \times g$, 4 min).

2.3. Nanoparticles Characterization

Optical and morphological particles characterization was carried out using UV-vis-NIR spectroscopy (Perkin-Elmer LAMBDA 950 spectrophotometer, Scientific Laboratory Supplies, Wilford, Nottingham, UK), size/zeta potential analyzer (SZ-100 device, Horiba, ABX SAS, Amadora, Portugal), and transmission electron microscopy (JEOL 2100 200 kV TEM, Izasa Scientific, Carnaxide, Portugal). The sample concentration of 12.5 mg/L for PVP-Ag15nm and PVP-Ag100nm and 50 mg/L for PVP-Ag50–80nm was loaded into a quartz cuvette, 10 mm optical path, to perform light scattering and UV-vis analysis. A scattering angle of 90° and a working temperature of 25 °C was used for size determination. For TEM analysis, the particles were subjected to several centrifugation cycles (3 cycles of 60 min at $8960 \times g$ for PVP-Ag15nm; 3 cycles of 15 min at $2500 \times g$ for PVP-Ag100nm; and 1 cycle of 10 min at $1500 \times g$ for PVP-Ag50–80nm) in order to remove the excess PVP that could interfere with the analysis. To prevent particle aggregation, several drops of the suspension were placed on the grid by drying the excess every time. Furthermore, 400 Cu mesh formvar/carbon grids were used for gold investigations, and instead, pure carbon 400 Ti mesh grids were used when silver was analyzed. In both cases, an acceleration voltage of 200 kv was used.

2.4. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

For SERS average experiments, 4ABT functionalized AuNSs were chosen as the SERS substrate for the detection of different concentration of AgNPs, in a range 12.5–0.025 mg/L for single particles and 50–0.1 mg/L in the case of aggregates. Different concentrations of AgNPs were added to the AuNSs suspension (1:1, v/v) and 20 μ L of the suspension was then placed on a silicon wafer. The SERS measurements were carried out in the liquid.

The standards were prepared by diluting the testing AgNPs in ultrapure water or synthetic seawater. The artificial seawater was prepared by dissolving a commercial salt (ICA Sal Marinho Basic Plus, Aqualovers, Portugal) in DI water (35 ppm salinity) in order to assess salt interference during detection.

SERS spectra were acquired using a 300 Alpha Confocal Raman (WiTEC, Ulm, Germany) using 10 \times objective and a portable Raman spectrometer (B&Wtek, ILC-Inst. De Lab. E Científicos, Lisboa, Portugal) with optical fiber configuration, where 785 nm was the excitation laser line used. The spectra acquisition was performed for 3 s and with 1 scan per measurement and collected using a laser power of 70 mW and 50 mW for the Confocal and the portable Raman, respectively. The resulting SERS spectra were processed using SpectraGriph 1.2.14 software (Software for optical spectroscopy 2016-20 developed by Dr. Friedrich Menges, Oberstdorf, Germany) after being baseline corrected.

3. Results

3.1. Physicochemical Characterization of AgNPs in Artificial Seawater

We selected three commercial AgNPs coated with polyvinylpyrrolidone (PVP), named here PVP-Ag15nm NPs, PVP-Ag50–80nm NPs, and PVP-Ag100nm NPs. PVP is a well-known stabilizer agent of NPs, and it has been amply used as a stabilizer of AgNPs [37]. Figure 1 shows morphology and size distribution characterized by transmission electron microscopy (TEM). TEM analysis reveals that all NPs present a pseudo-spherical shape and a mean size of 24 ± 7 nm for PVP-Ag15nm NPs, 42 ± 21 nm for PVP-Ag50–80nm NPs, and 96 ± 25 nm for PVP-Ag100nm NPs.

AgNPs have unique optical properties resulting in a very particular UV-vis extinction spectrum in the visible range, which corresponds to the typical yellow color. When excited by an electromagnetic field, AgNPs support coherent oscillations of the surface conduction electrons, and this phenomenon, confined oscillations of the charge density, is referred to as localized surface plasmon resonance (LSPR) [38]. This LSPR can be used to obtain

information about the colloidal stability of the AgNPs dispersion. Figure 2 shows the UV-vis extinction spectra of three commercial PVP-AgNPs in both ultrapure water and artificial seawater. The extinction spectra of the PVP-Ag15nm NPs and PVP-Ag100nm NPs displayed a single LSPR band centered at 412 nm and 425 nm in both media, which demonstrated that these nanoparticles are colloidally stable in media with high ionic strength like artificial seawater even after 28 days (see Figure S2a–f). This is due to the presence of PVP since this polymer stabilizes the NPs by electrosteric repulsion [39]. However, the extinction spectrum of PVP-Ag50–80nm NPs showed a broad LSPR band developed in the visible-near-infrared region and a decrease of the concentration when in artificial seawater. These features can be attributed to the aggregation of AgNPs, i.e., the plasmonic coupling between closely packed NPs, especially in the presence of high ionic strength. Interestingly, the presence of PVP prevented the collapse running out-of-control and stabilized the formed aggregates in artificial seawater (Figure 2b).

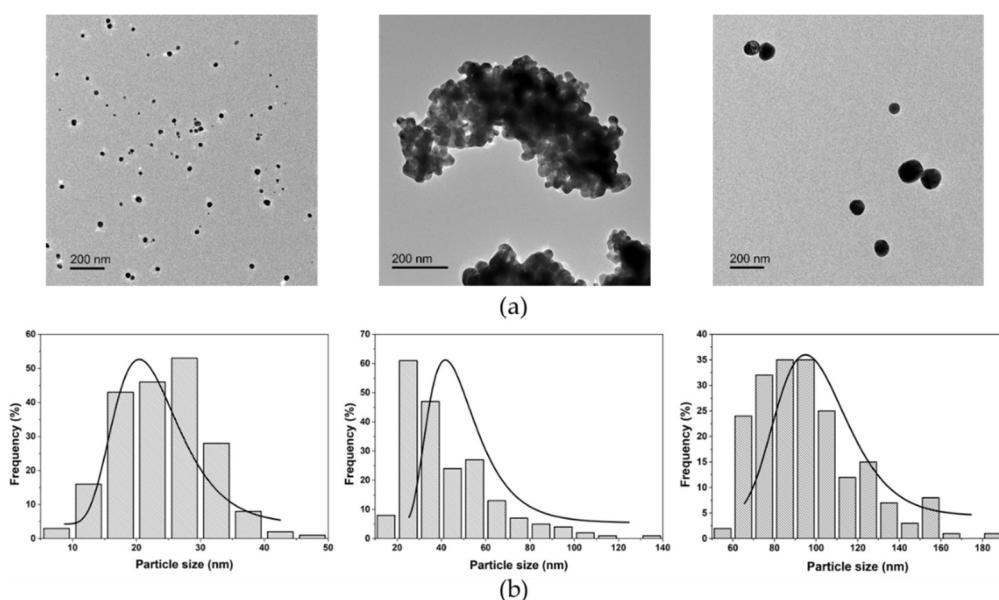


Figure 1. (a) TEM images show morphology and particles dispersion. Particles of 15 (PVP-Ag15nm NPs), 50–80 (PVP-Ag50–80nm NPs), and 100 nm (PVP-Ag100nm NPs) are shown. Scale bar of 200 nm. (b) Particle size distribution, estimated by measuring an average of 200 particles, and Gaussian fitting are represented by histograms and continuous line, respectively.

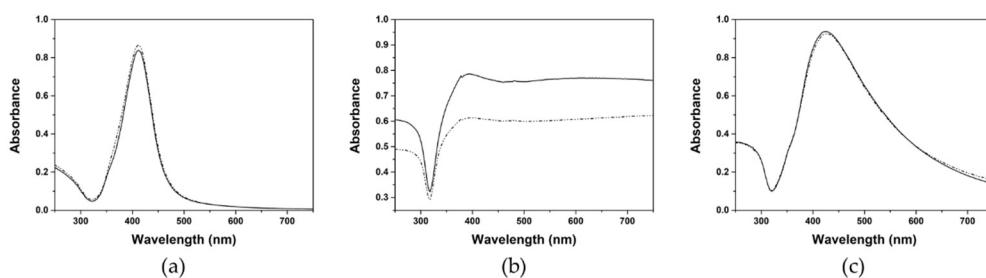


Figure 2. UV-vis extinction spectra of (a) PVP-Ag15nm NPs, (b) PVP-Ag50–80nm NPs, and (c) PVP-Ag100nm NPs dispersed in ultrapure water and artificial seawater, represented by solid line and dotted line spectra, respectively.

Owing to the fact the polymer shell can act as a dielectric spacer and be an effective insulator, which may hinder additional coupling of LSPR oscillations between associated particles provoking the decrease of the sensitivity of the UV-vis spectroscopy on the aggregation monitoring [40]. DLS overcomes this obstacle and therefore the hydrodynamic size of the AgNPs was also characterized. DLS analysis in ultrapure water confirmed the UV-vis results (Table 1). PVP-Ag15nm NPs and PVP-Ag100nm NPs had a hydrodynamic

size of 49 ± 3 nm and 139 ± 2 nm, respectively, which are higher diameters than the diameter obtained by TEM. This is due to the presence of the PVP layer around AgNPs. PVP-Ag50–80nm NPs presented a hydrodynamic size of 619 ± 75 nm confirming the aggregation of these AgNPs. Interestingly, these AgNPs dispersed in ultrapure water presented different NP populations with different sedimentation as shown in the time evolution of the hydrodynamic size in Figure S2h. The presence of PVP is crucial, especially when the particles are dispersed in artificial seawater. Hydrodynamic diameters of 47 ± 2 nm and 97 ± 1 nm are recorded for PVP-Ag15nm NPs and PVP-Ag100nm NPs, showing that the presence of salts does not destabilise the NPs even after 28 days of exposure to this medium (see Figure S2). The value of 1348 ± 407 reported for PVP-Ag50–80nm NPs proves instead that the lower amount of PVP is not enough to prevent aggregation to occur and the particles re-arranged themselves into newly formed aggregates. Moreover, these AgNPs sedimented completely after 1 day of being dispersed in seawater as shown in the time evolution of the UV-Vis extinction spectrum (Figure S2g) and the decrease in the DLS intensity (kcounts) over time (Figure S2j). The hydrodynamic size of PVP-Ag50–80nm NPs displayed an increase in the first 2 h dispersed in seawater and then reached an equilibrium, maintaining a similar aggregate size before complete sedimentation (Figure S2i). The PVP-Ag50–80nm NPs were redispersed after complete sedimentation and their hydrodynamic size were measured by DLS. A similar size was obtained before and after redispersion (Figure S2l).

Table 1. Physicochemical characterization of selected AgNPs.

	Ultrapure Water			Artificial Seawater		
	PVP-15nmAg NPs	PVP-100nmAg NPs	PVP-50–80nmAg NPs	PVP-15nmAg NPs	PVP-100nmAg NPs	PVP-50–80nmAg NPs
Hydrodynamic diameter ¹ (nm)	49 ± 3	139 ± 2	618 ± 83	47 ± 2	97 ± 1	1348 ± 407
PDI ² (%)	57 ± 7	20 ± 2	146 ± 11	36 ± 3	27 ± 4	78 ± 12
Z potential ³ (mV)	-24 ± 5	-21 ± 12	-83 ± 6	-9 ± 16	-6 ± 10	-5 ± 10

¹ Mean hydrodynamic diameter and polydispersity index. ² obtained by DLS at a scattering angle of 90° and 25°C . DLS measurements were carried out by quintupled mean \pm standard deviation (SD). ³ Zeta potentials were measured in 5 runs (mean \pm SD).

Zeta-potential measurements reveal a negatively charged surface in the case of AgNPs dispersed in ultrapure water, confirming the repulsion between similarly charged particles in the dispersion (Table 1). These values can be attributed to the negatively charged PVP polymer (zeta potential—30 mV) offering a stabilization of AgNPs due to the combined electrosteric repulsion [39]. A higher negative value of -83 ± 6 mV is recorded for PVP-Ag50–80nm NPs, demonstrating, once again, that the initial aggregates are stable. All AgNPs in seawater showed a decrease (i.e., lower net surface charge) in the zeta potential values: -9 ± 16 , -6 ± 10 , and -5 ± 10 mV for PVP-Ag15nm NPs, PVP-Ag100nm NPs, and PVP-Ag50–80nm NPs, respectively. This decrease likely is due to the compression of electric double layer (EDL) promoted by the presence of high ionic strength in seawater. This compression of EDL induces aggregation when the only repulsive force is electrostatic; however, in this case, the steric repulsions remain due to the presence of PVP on the surface, keeping AgNPs stable. In the case of PVP-Ag50–80nm NPs, an increase of the hydrodynamic size in seawater was observed, which can be attributed to the fact that the concentration of PVP is lower than in the other two NPs (0.2% vs. 75%).

3.2. Detection of AgNPs in Artificial Seawater Using SERS

We selected AuNSs as the SERS active substrate because they offer an enhancement factor of the Raman signal up to 10^{12} thanks to the lowest-energy, localized surface plasmon mode highly concentrated at the apex of the tips [41,42]. In addition, the core of the AuNSs acts as an electron reservoir due to strong plasmonic coupling effects, contributing

significantly to the enhancement of the SERS signal. AuNSs were synthesized (see more details in Methods section) by reducing a gold(III) salt in N,N-dimethylformamide (DMF) in the presence of a high concentration of PVP and preformed 13 nm-spherical PVP-coated Au seeds (see TEM image and UV-vis spectrum in Figure S3). TEM analysis of AuNSs reveals a particle size diameter of 63 ± 7 nm (Figure 3a,b). The UV-vis spectrum of AuNSs showed two LSPR modes, one of them showing a maximum wavelength in the near infrared region (NIR) at 753 nm, related to a plasmon mode localized at the NSs tips and a second lower mode, at 540 nm, associated with the internal core. As a consequence, we selected the 785 nm laser as the excitation source adopted in the SERS measurement because this laser overlaps with the LSPR mode at the tips (see Figure 3d). In addition, this laser was selected to avoid any photodegradation of the probe molecule (4-aminobenzenethiol, 4ABT) used and reduced the possible matrix interference suppressing the fluorescence background and absorption from organic matter dissolved in real water samples.

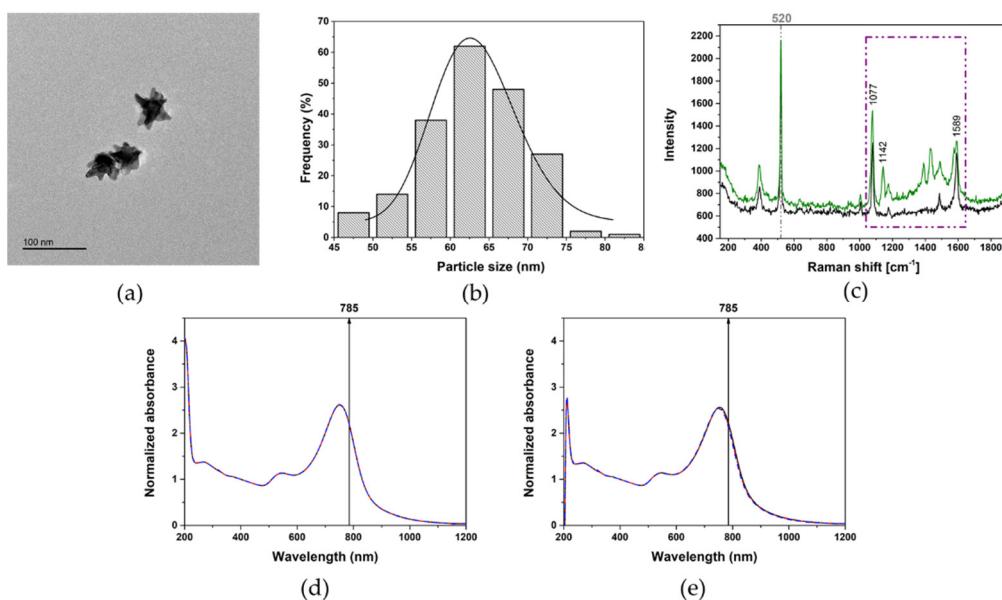


Figure 3. (a) TEM image of AuNSs and (b) relative particles size distribution and Gaussian fitting estimated on an average of 200 particles analysed. Scale bar of 100 nm. (c) Average SERS spectra of 4ABT-functionalised AuNSs (1 mM of AuNSs, black line) and sandwich-like configuration of AgNPs-4ABT-AuNSs (0.5 mM of AuNSs in the presence of 25 mg/L of PVP-Ag100nm NPs, green line). The characteristic peaks of 4ABT (purple dashed rectangle, C-H ring bending 1142 cm^{-1} and ring stretching 1077 and 1589 cm^{-1}) are shown. The light-grey dashed line indicates the characteristic peak of silicon (520 cm^{-1}) that was used as internal standard. AuNSs stability in (d) ultrapure water and (e) artificial seawater is shown. Times of 0, 15, and 30 min are represented by black, red, and blue lines, respectively. Black arrows show the wavelength excitation source at 785 nm used in SERS analysis.

Before performing SERS experiments, we assessed the colloidal stability of AuNSs in order to confirm that the chosen SERS substrate is not affected by the influence of the surrounding environment. As explained before, level of aggregation, formation of hot-spot regions, and modification of the involved particles could modify SERS sensitivity also affecting system reproducibility. AuNSs were tested for their colloidal stability in both ultrapure water and synthetic seawater for a period of time of 30 min, allowing AgNPs detection. Recorded spectra show how AuNSs are not affected by the surrounding media and the presence of high ionic strength is not able to modify their initial colloidal stability (Data are shown in Figure 3d,e).

SERS is a surface-sensitive technique and, by coupling metallic surfaces with a reporter molecule, it is possible to increase not only the sensitivity but also the specificity toward the interested analyte. We then functionalized AuNSs with 4ABT, which is able to form a self-assembled monolayer (SAM) on the Au surface by forming S-Au bond. As a consequence,

a strong SERS signal in suspension (i.e., average SERS) was recorded (Figure 3c, black spectrum) [43].

This average SERS spectrum displays three peaks at 1589, 1077, and 390 cm^{-1} , which correspond to ring stretching vibrations. The amine group of 4ABT, in para-substitution, has a strong interaction with Ag surface, allowing a specific detection of AgNPs. This interaction between the amine group and AgNPs generated very clear changes in SERS spectrum of 4ABT (Figure 3c, green spectrum). Apart from the obvious enhancement of the SERS intensity, four additional peaks are observed: 1142, 1175, 1390, and 1431 cm^{-1} that correspond to C-H ring bending vibrations. Despite its extensive use in SERS, it is common to consider *p*-ABT as a molecule with an abnormal enhancement mechanism depending on both substrates (i.e., Au and Ag) and used experimental conditions [26,27]. In this case, our system could be considered, which forms a sandwich-like configuration of AuNSs-4ABT-AgNPs (see Figure 4a) and the selective enhancement of those peaks can be associated with the charge transfer mechanism (i.e., charge transfer between both metal NPs coupled with the vibrations of 4ABT), as reported by Zhou et al. [43].

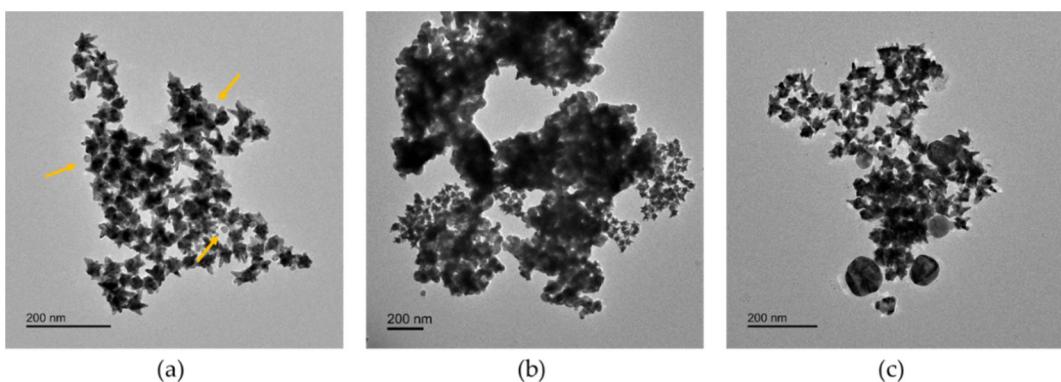


Figure 4. TEM images of AgNPs-4ABT-AuNSs interaction. (a) PVP-Ag15nm NPs, (b) PVP-Ag50–80nm NPs, and (c) PVP-Ag100nm NPs in ultrapure water. Scale bar of 200 nm. Yellow arrows point AgNPs.

In this work, we proposed an indirect detection based on changes in the 4ABT SERS signal in presence of AgNPs. We chose this indirect SERS strategy because it increases the selectivity by covalent interaction of the amino group and Ag surface and the enhancement of SERS signal produced by the formation of sandwich-like configuration AgNPs-4ABT-AuNSs can be correlated with the AgNPs concentration. The correlation among silver concentrations was determined by the analysis of the band at $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$, the one supposed to arise from electromagnetic field enhancement coupled with chemical enhancement [44]. The in-suspension SERS analysis was performed (i.e., the measurements were done in liquid) and all integrated areas under the 1080 cm^{-1} peak were normalized with respect to those of silicon wafers (520 cm^{-1}) used for support and internal standard. For an on-field monitoring application, this average SERS strategy should be implemented into a portable system. Thus, average SERS spectra of 4ABT on AuNSs in the presence of different concentration of PVP-15nmAg NPs with a portable Raman system and a confocal Raman system with a $10\times$ objective were acquired to compare the performance. The SERS measurements were carried out both in ultrapure water, as a control medium, and artificial seawater. Figure 5a and Figure S4c show the calibration curve, where the error bars indicate standard deviations from three independent experiments, obtained in both media (ultrapure water, in green, and artificial seawater, in red) and using the two Raman systems. For both ultrapure water and seawater, the plot of the ratio between the areas under the peaks at 1080 and 520 cm^{-1} against AgNPs concentration showed a good linear correlation with r^2 values of 0.8464 (ultrapure water) and 0.9403 (seawater) for portable Raman system and 0.9162 and 0.9137 for confocal Raman system, when PVP-Ag15nm NPs were analyzed. The limit of detection (LoD) was calculated from the sensitivity of the calibration curve using the equation $3.3 SDy/a$, where SDy is the standard deviation

of the response of the curve and a is the slope of the calibration curve. LoD values were similar for both the media and the two Raman systems: 3.08 ± 1.47 (ultrapure water) and 2.15 ± 1.22 mg/L (seawater) for the portable Raman system and 3.12 ± 2.28 (ultrapure water) and 2.17 ± 0.93 mg/L for the confocal Raman system. The similar performance shown for both systems can be explained by the fact that we selected an average SERS strategy (i.e., in liquid) for AgNPs detection, and therefore we did not take advantage of the better spatial resolution of the confocal Raman system.

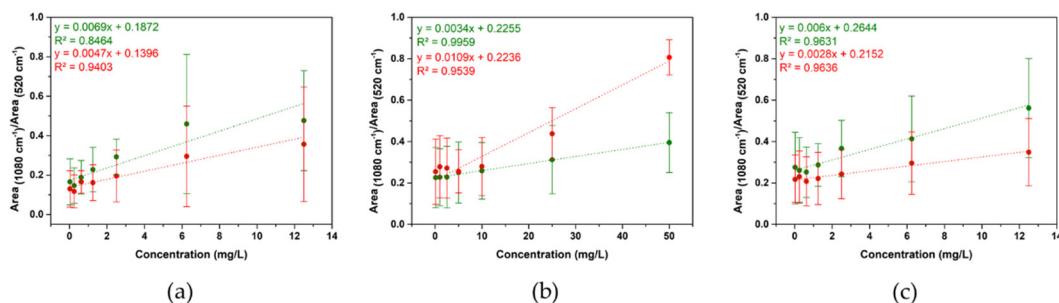


Figure 5. Calibration curve of (a) PVP-15nmAg NPs, (b) PVP-50–80nmAg NPs, and (c) PVP-100nmAg NPs detection in ultrapure water (green line) and artificial seawater (red line).

We performed SERS analysis about the possible effect of the particle size and aggregation degree of AgNPs using only the portable Raman system. Thus, we carried out the set of SERS measurements using the same conditions as before for PVP-15nmAg NPs, PVP-100nmAg NPs, and PVP-50–80nmAg NPs. Figure 5 shows the calibration curves for PVP-50–80nmAg NPs (b) and PVP-100nmAg NPs (c) obtained in both ultrapure water and artificial seawater. A better fit was obtained related to PVP-100nmAg NPs (r^2 of 0.9631 in ultrapure water and 0.9636 in seawater) and PVP-50–80nmAg NPs (r^2 of 0.9959 in ultrapure water and 0.9539 in seawater). This is probably due to the better coupling of the LSPR band (see Figure 2b,c) to the 785 nm excitation wavelength and the higher local electromagnetic field generated from NPs with bigger size [45]. However, similar LoD values were obtained in ultrapure water: 2.28 ± 1.46 mg/L for PVP-100nmAg NPs and 3.75 ± 1.00 mg/L for PVP-50–80nmAg NPs, which may be related to AgNPs-4ABT-AuNSs sandwich-like configuration (see Figure 4b,c). The enhancement is produced in the gap between AuNSs and AgNPs and non-all surface area of AgNPs is covered by 4ABT. Interestingly, we observed different behavior of the detection in seawater. The LoD values were similar for AgNPs that remained colloidally stable in seawater (see Figure 2, Table 1 and Table S2), i.e., PVP-15nmAg NPs (LoD = 2.15 ± 1.22 mg/L) and PVP-100nmAg NPs 1.51 ± 0.71 mg/L), while LoD for Ag aggregates increased 4-fold (6.08 ± 1.21 mg/L), demonstrating that aggregation has an extremely high impact on the sensitivity of our average SERS approach. This can be explained in terms of decreasing the available surface area that interacts with 4ABT-AuNSs (see Figure 4b). Nonetheless, the integration of a pre-concentration step will be a considerable improvement to bring the detection level down to an order of magnitude relevant to environmental concentrations [46].

4. Discussion

Herein, we have designed an average SERS (i.e., in-suspension SERS) strategy for the detection of PVP-coated AgNPs in artificial seawater using a portable Raman system. We selected 4ABT as a chemoreceptor to trap the AgNPs, which was already used as an SERS reporter for AgNPs detection in dietary supplement products and nasal spray [47]. However, higher AgNPs concentrations were used (20 mg/L) and a microRaman spectrometer was used for detection. In this study, the main aim was to design a detection system that could be implemented in a portable Raman system, allowing its future use for point-of-care monitoring, despite the initial limitations of those systems such as less spatial resolution, less sensitivity, less reproducibility, and lower control of emission losses. To this

aim, we performed the measurement in a suspension [48] and used a silicon wafer as an internal standard, which helped in overcoming those limitations. This, together with the short time for analysis and being a non-destructive technique, makes SERS a promising approach for the detection of AgNPs traces in the aquatic environment, regardless of size and particles aggregation. With this in-suspension SERS strategy, it was possible to detect a concentration of AgNPs down to 1.51 ± 0.71 mg/L. The sensitivity was affected by the aggregation of AgNPs, increasing to almost 4-fold in the LoD when NPs were aggregated.

It is important to note that despite the high demand for portable systems that can detect and characterize these new emerging nanocontaminants, the innovation of these portable systems has been focused on the detection of nanoplastics [15,49] and pathogens at nanoscale (e.g., virus) [50]. This could be because of the wide variety of plastics found in the ocean at a high concentration: 11.6–21.1 million tons in the Atlantic Ocean [51]. However, the effort of the development of these portable systems should also address the detection of engineered inorganic nanoparticles (EINPs) in the aquatic system. The predicted environmental concentration (PEC) for these EINPs covers a wide range from the highest PEC for titanium dioxide NPs in the scale of mg/L [22] to a concentration of ng/L of total silver for AgNPs [46]. Taking into account the PEC for AgNPs to be able to implement our average SERS methods, a pre-concentration step must be integrated. The utilization of solid phase extraction [52] or cloud point extraction [53] has been reported for this purpose; however, these were coupled to “non-portable” analytical methods: Flame atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry, respectively.

Despite the appeal of this strategy, important challenges hinder the implementation of the portable sensors based on SERS: (1) The transformation of these nanocontaminants as a function of chemical transformation (e.g., aggregation or dissolution and (2) the matrix interferences (e.g., sulfidation), organic matter or the presence of others plasmonic NPs), which compromise the robustness, selectivity, and sensitivity of the SERS-based method. In the case of the effect of AgNPs transformation, we already demonstrated the negative impact of aggregation on the SERS strategy increasing the LoD 4-fold. The dissolution could apparently have less impact since the variation of the sensitivity of the method as a function of the size was minimal (PVP-15nmAg NPs LoD 2.15 ± 1.22 mg/L and PVP-100nmAg NPs LoD 1.51 ± 0.71 mg/L). The formation of Ag₂S from the sulfidation of AgNPs in seawater [54] would have an important impact on the SERS enhancement, which does not mean “a decrease in the signal”. The contributions of charge-transfer in the SERS effect of Ag and Ag₂S NPs are different, being higher in the case of Ag₂S as reported by Fu et al. [55]. Moreover, other noble metal NPs that could be released into the environment at significant concentrations would be platinum, palladium, or copper NPs from the catalysis industry and the wood preservation industry. Therefore, we cannot rule out their interference in the detection system and the calibration curves for AgNPs detection must be performed in the presence of these NPs (including Ag₂S). It is then possible that mixed signals will be obtained with the added contribution of several types of plasmonic NPs preventing the exact identification; however, in this case, we may be able to extract a correlation in terms of “AgNPs equivalents”, which would nevertheless have high impact as an early warning system.

Given the promising results, the next steps will be to develop a portable device involving a sample preparation module coupled with the SERS-based detection module in order to reduce the challenges presented by on real samples, reduce the lack of specificity and noise, and increase the robustness of these sensors.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nano11071711/s1>, Figure S1: Characterization of physicochemical properties of AgNPs with a diameter of 100 nm as a function of each purification and functionalization step; Figure S2: Spectral evolution of optical absorbance and hydrodynamic size evolution of PVP-15nmAg NPs (upper line) and PVP-100nmAg NPs; Figure S3: Physicochemical characterization of spherical AuNPs with a diameter of 15 nm; and Figure S4: SERS analysis of PVP-15nmAgNPs dispersed in both ultrapure water and artificial seawater using a confocal Raman microscope.

Author Contributions: Conceptualization L.R.-L.; funding acquisition B.E.; investigation M.Q., I.P., A.V., and L.R.-L.; writing—original draft preparation M.Q. and L.R.-L.; writing—review and editing, M.Q., I.P., A.V., L.R.-L., and B.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by NANOCULTURE Interreg Atlantic Area project (EAPA_590/2018) and ACUINANO Interreg POCTEP project (code 1843). L.R.-L. acknowledges funding to FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) for the Scientific Employment Stimulus Program (2020.04021.CECIND).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the database is still developing and the public access is still limited.

Acknowledgments: We thanks the Advanced Electron microscopy (AEMIS) and Nanophotonics & Bioimaginis facilities and staff for their contribution to this publication.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Auría-Soro, C.; Nesma, T.; Juanes-Velasco, P.; Landeira-Viñuela, A.; Fidalgo-Gómez, H.; Acebes-Fernandez, V.; Gongora, R.; Parra, M.J.A.; Manzano-Roman, R.; Fuentes, M. Interactions of nanoparticles and biosystems: Microenvironment of nanoparticles and biomolecules in nanomedicine. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1365. [[CrossRef](#)]
2. Sarfraz, J.; Gulin-Sarfraz, T.; Nilsen-Nygaard, J.; Pettersen, M.K. Nanocomposites for food packaging applications: An overview. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wang, H.; Thorling, C.A.; Liang, X.; Bridle, K.R.; Grice, J.E.; Zhu, Y.; Crawford, D.H.G.; Xu, Z.P.; Liu, X.; Roberts, M.S. Diagnostic imaging and therapeutic application of nanoparticles targeting the liver. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 939–958. [[CrossRef](#)]
4. Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 403–419. [[CrossRef](#)]
5. Fabrega, J.; Luoma, S.N.; Tyler, C.R.; Galloway, T.S.; Lead, J.R. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* **2011**, *37*, 517–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Benn, T.M.; Westerhoff, P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4133–4139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Geranio, L.; Heuberger, M.; Nowack, B. The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 8113–8118. [[CrossRef](#)]
8. Tortella, G.R.; Rubilar, O.; Durán, N.; Diez, M.C.; Martínez, M.; Parada, J.; Seabra, A.B. Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *390*, 121974. [[CrossRef](#)]
9. Ricardo, A.I.C.; Fariñas, N.R.; Bernardo, F.J.G.; Martín-Doimeadios, R.C.R.; Ríos, Á. Screening-confirmation strategy for nanomaterials involving spectroscopic analytical techniques and its application to the control of silver nanoparticles in pastry samples. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *246*, 119015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Culková, E.; Lukáčová-Chomisteková, Z.; Bellová, R.; Melicherčíková, D.; Durdík, J.; Rievař, M.; Vojs, M.; Tomčík, P. Voltammetric detection of silver in commercial products on boron doped diamond electrode: Stripping at lowered potential in the presence of thiosulfate ions. *Mon. Chem.* **2020**, *151*, 1009–1017. [[CrossRef](#)]
11. Laborda, F.; Bolea, E.; Cepriá, G.; Gómez, M.T.; Jiménez, M.S.; Pérez-Arantegui, J.; Castillo, J.R. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *904*, 10–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mahdi, K.N.M.; Peters, R.J.B.; Klumpp, E.; Bohme, S.; van der Ploeg, M.; Ritsema, C.; Geissen, V. Silver nanoparticles in soil: Aqueous extraction combined with single-particle ICP-MS for detection and characterization. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* **2017**, *7*, 24–33. [[CrossRef](#)]
13. Yang, Y.; Long, C.L.; Li, H.P.; Wang, Q.; Yang, Z.G. Analysis of silver and gold nanoparticles in environmental water using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* **2016**, *563–564*, 996–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ramos, K.; Gómez-Gómez, M.M.; Cámaras, C.; Ramos, L. Silver speciation and characterization of nanoparticles released from plastic food containers by single particle ICPMS. *Talanta* **2016**, *151*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Asamoah, B.O.; Kanyathare, B.; Roussey, M.; Peiponen, K.E. A prototype of a portable optical sensor for the detection of transparent and translucent microplastics in freshwater. *Chemosphere* **2019**, *231*, 161–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wu, M.; Zhang, C.; Ji, Y.; Tian, Y.; Wei, H.; Li, C.; Li, Z.; Zhu, T.; Sun, Q.; Man, B.; et al. 3D Ultrasensitive Polymers-Plasmonic Hybrid Flexible Platform for In-Situ Detection. *Polymers* **2020**, *12*, 392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Willner, M.R.; Vikesland, P.J. Nanomaterial enabled sensors for environmental contaminants. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 1–16. [[CrossRef](#)]

18. Demirel, G.; Usta, H.; Yilmaz, M.; Celik, M.; Alidagi, H.A.; Buyukserin, F. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): An adventure from plasmonic metals to organic semiconductors as SERS platforms. *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6*, 5314–5335. [CrossRef]
19. Hankus, M.E.; Li, H.; Gibson, G.J.; Cullum, B.M. Surface-enhanced Raman scattering-based nanoprobe for high-resolution, non-scanning chemical imaging. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7535–7546. [CrossRef] [PubMed]
20. Culha, M.; Cullum, B.; Lavrik, N.; Klutse, C.K. Surface-enhanced Raman scattering as an emerging characterization and detection technique. *J. Nanotechnol.* **2012**, *2012*. [CrossRef]
21. Guo, H.; Zhang, Z.; Xing, B.; Mukherjee, A.; Musante, C.; White, J.C.; He, L. Analysis of silver nanoparticles in antimicrobial products using surface-enhanced raman spectroscopy (SERS). *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 4317–4324. [CrossRef]
22. Shi, W.; Han, Y.; Guo, C.; Su, W.; Zhao, X.; Zha, S.; Wang, Y.; Liu, G. Ocean acidification increases the accumulation of titanium dioxide nanoparticles ($n\text{TiO}_2$) in edible bivalve mollusks and poses a potential threat to seafood safety. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
23. Park, S.; Lee, J.; Ko, H. Transparent and Flexible Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Sensors Based on Gold Nanostar Arrays Embedded in Silicon Rubber Film. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 44088–44095. [CrossRef]
24. Rodríguez-Lorenzo, L.; Garrido-Maestu, A.; Bhunia, A.K.; Espiña, B.; Prado, M.; Diéguez, L.; Abalde-Cela, S. Gold Nanostars for the Detection of Foodborne Pathogens via Surface-Enhanced Raman Scattering Combined with Microfluidics. *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, *2*, 6081–6086. [CrossRef]
25. Rodríguez-Lorenzo, L.; Álvarez-Puebla, R.A.; Pastoriza-Santos, I.; Mazzucco, S.; Stéphan, O.; Kociak, M.; Liz-Marzán, L.M.; García de Abajo, F.J. Zeptomol Detection Through Controlled Ultrasensitive Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4616–4618. [CrossRef]
26. Kim, K.; Kim, K.L.; Shin, D.; Choi, J.Y.; Shin, K.S. Surface-enhanced Raman scattering of 4-aminobenzenethiol on Ag and Au: PH dependence of b 2-type bands. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 4774–4779. [CrossRef]
27. Wu, D.Y.; Liu, X.M.; Huang, Y.F.; Ren, B.; Xu, X.; Tian, Z.Q. Surface catalytic coupling reaction of p-mercaptoaniline linking to silver nanostructures responsible for abnormal SERS enhancement: A DFT study. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18212–18222. [CrossRef]
28. Rycenga, M.; Camargo, P.H.C.; Li, W.; Moran, C.H.; Xia, Y. Understanding the SERS Effects of Single Silver Nanoparticles and Their Dimers, One at a Time. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 696–703. [CrossRef] [PubMed]
29. Mirzaei, A.; Janghorban, K.; Hashemi, B.; Bonyani, M. Characterization and optical studies of PVP-capped silver nanoparticles. *J. Nanostruct. Chem.* **2017**, *7*, 37–46. [CrossRef]
30. Tejamaya, M.; Römer, I.; Merrifield, R.C.; Lead, J.R. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 7011–7017. [CrossRef] [PubMed]
31. Jiménez-Lamana, J.; Slaveykova, V.I. Silver nanoparticle behaviour in lake water depends on their surface coating. *Sci. Total Environ.* **2016**, *573*, 946–953. [CrossRef]
32. Yang, Y.; Xu, S.; Xu, G.; Liu, R.; Xu, A.; Chen, S.; Wu, L. Effects of ionic strength on physicochemical properties and toxicity of silver nanoparticles. *Sci. Total Environ.* **2019**, *647*, 1088–1096. [CrossRef] [PubMed]
33. Kelly, J.F.; Blake, T.A.; Bernacki, B.E.; Johnson, T.J. Design Considerations for a Portable Raman Probe Spectrometer for Field Forensics. *Int. J. Spectrosc.* **2012**, *2012*, 1–15. [CrossRef]
34. Barone, G.; Bersani, D.; Crupi, V.; Longo, F.; Longobardo, U.; Lottici, P.P.; Aliatis, I.; Majolino, D.; Mazzoleni, P.; Raneri, S.; et al. A portable versus micro-Raman equipment comparison for gemmological purposes: The case of sapphires and their imitations. *J. Raman Spectrosc.* **2014**, *45*, 1309–1317. [CrossRef]
35. Moore, M.M.; Kanekar, S.G.; Dhamija, R. Ethylene Glycol Toxicity: Chemistry, Pathogenesis, and Imaging. *Radiol. Case Rep.* **2008**, *3*, 122. [CrossRef] [PubMed]
36. Enüstün, B.V.; Turkevich, J. Coagulation of Colloidal Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3317–3328. [CrossRef]
37. Slistan-Grijalva, A.; Herrera-Urbina, R.; Rivas-Silva, J.F.; Ávalos-Borja, M.; Castillón-Barraza, F.F.; Posada-Amarillas, A. Synthesis of silver nanoparticles in a polyvinylpyrrolidone (PVP) paste, and their optical properties in a film and in ethylene glycol. *Mater. Res. Bull.* **2008**, *43*, 90–96. [CrossRef]
38. Pastoriza-Santos, I.; Hamanaka, Y.; Fukuta, K.; Nakamura, A.; Liz-Marzán, L.M. Anisotropic Silver Nanoparticles: Synthesis and Optical Properties. In *Low-Dimensional Systems: Theory, Preparation, and Some Applications*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 65–75.
39. Moore, T.L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6287–6305. [CrossRef] [PubMed]
40. Vanderkooy, A.; Chen, Y.; Gonzaga, F.; Brook, M.A. Silica Shell/Gold Core Nanoparticles: Correlating Shell Thickness with the Plasmonic Red Shift upon Aggregation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 3942–3947. [CrossRef]
41. Pazos-perez, N.; Guerrini, L.; Alvarez-puebla, R.A. Plasmon Tunability of Gold Nanostars at the Tip Apexes. *ACS Omega* **2018**, *12*, 17173–17179. [CrossRef]
42. Rodríguez-Lorenzo, L.; Álvarez-Puebla, R.A.; De Abajo, F.J.G.; Liz-Marzán, L.M. Surface enhanced Raman scattering using star-shaped gold colloidal nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 7336–7340. [CrossRef]
43. Zhou, Q.; Li, X.; Fan, Q.; Zhang, X.; Zheng, J. Charge transfer between metal nanoparticles interconnected with a functionalized molecule probed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3970–3973. [CrossRef] [PubMed]

44. Kim, K.; Choi, J.; Lee, H.B.; Shin, K.S.; Kim, K.; Choi, J.; Lee, H.B.; Shin, K.S. Effects of size of Ag nanoparticles and the excitation wavelength Raman scattering of 4-aminobenzenethiol sandwiched between Ag nanopartic. *J. Chem. Phys.* **2011**, *128*, 124705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hong, S.; Li, X. Optimal Size of Gold Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy under Different Conditions. *J. Nanomater.* **2013**, *2013*, 1–9. [[CrossRef](#)]
46. McGillicuddy, E.; Murray, I.; Kavanagh, S.; Morrison, L.; Fogarty, A.; Cormican, M.; Dockery, P.; Prendergast, M.; Rowan, N.; Morris, D. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci. Total Environ.* **2017**, *575*, 231–246. [[CrossRef](#)]
47. Nguyen, T.H.D.; Zhou, P.; Mustapha, A.; Lin, M. Use of amino thiophenol as an indicator for the analysis of silver nanoparticles in consumer products by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analyst* **2016**, *141*, 5382–5389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Pérez-Jiménez, A.I.; Lyu, D.; Lu, Z.; Liu, G.; Ren, B. Surface-enhanced Raman spectroscopy: Benefits, trade-offs and future developments. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 4563–4577. [[CrossRef](#)]
49. Asamoah, B.O.; Uurasjärvi, E.; Räty, J.; Koistinen, A.; Roussey, M.; Peiponen, K.-E. Towards the Development of Portable and In Situ Optical Devices for Detection of Micro-and Nanoplastics in Water: A Review on the Current Status. *Polymers* **2021**, *13*, 730. [[CrossRef](#)]
50. He, L.; Özdemir, S.K.; Zhu, J.; Kim, W.; Yang, L. Detecting single viruses and nanoparticles using whispering gallery microlasers. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 428–432. [[CrossRef](#)]
51. Pabortsava, K.; Lampitt, R.S. High concentrations of plastic hidden beneath the surface of the Atlantic Ocean. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4073. [[CrossRef](#)]
52. Bianchin, J.N.; Martendal, E.; Carasek, E. Determination of Trace Silver in Water Samples by Online Column Preconcentration Flame Atomic Absorption Spectrometry Using Termite Digestion Product. *J. Autom. Methods Manag. Chem.* **2011**, *2011*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Liu, J.; Chao, J.; Liu, R.; Tan, Z.; Yin, Y.; Wu, Y.; Jiang, G. Cloud Point Extraction as an Advantageous Preconcentration Approach for Analysis of Trace Silver Nanoparticles in Environmental Waters. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6496–6502. [[CrossRef](#)]
54. Khaksar, M.; Jolley, D.F.; Sekine, R.; Vasilev, K.; Johannessen, B.; Donner, E.; Lombi, E. In Situ Chemical Transformations of Silver Nanoparticles along the Water–Sediment Continuum. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 318–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fu, X.; Jiang, T.; Zhao, Q.; Yin, H. Charge-transfer contributions in surface-enhanced Raman scattering from Ag, Ag₂S and Ag₂Se substrates. *J. Raman Spectrosc.* **2012**, *43*, 1191–1195. [[CrossRef](#)]