

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO EM QUÍMICA

Flávia Campos Marques

Espalhamento Raman intensificado por superfície de uma única molécula do ácido 4-mercaptobenzoico e de corantes catiônicos e aniônicos.

Juiz de Fora

2022

Flávia Campos Marques

Espalhamento Raman intensificado por superfície de uma única molécula do ácido 4-mercaptobenzoico e de corantes catiônicos e aniônicos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Diego Pereira dos Santos

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática
da Biblioteca universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marques, Flávia Campos.

Espalhamento Raman intensificado por superfície de uma única molécula do ácido 4-mercaptopbenzoico e de corantes catiônicos e aniônicos / Flávia Campos Marques. 2022.
125 p. : il.

Orientador: Gustavo Fernandes Souza Andrade

Coorientador: Diego Pereira dos Santos

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.

1. SM-SERS. 2. 4-HMB. 3. Ligação de hidrogênio. 4. Corantes. I. Fernandes Souza Andrade, Gustavo, orient. II. Pereira dos Santos, Diego, coorient. III. Título.

Flávia Campos Marques

"Espalhamento Raman intensificado por superfície de uma única molécula do ácido 4-mercaptopbenzoico e de corantes catiônicos e aniônicos"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em 21 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade-Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Javier Erick Lobaton Villa
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 06/12/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Fernandes Souza Andrade**, Professor(a), em 21/12/2022, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Javier Erick Lobatón Villa**, Usuário Externo, em 21/12/2022, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO**, Usuário Externo, em 21/12/2022, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando Cappa de Oliveira**, Professor(a), em 21/12/2022, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Sant Ana**, Professor(a), em 21/12/2022, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Campos Marques**, Usuário Externo, em 21/12/2022, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1062194** e o código CRC **CC90AA91**.

Dedico este trabalho aos meus pais Renato e Edna, aos meus irmãos Bruna e Renato Júnior por todo apoio e por sempre estarem ao meu lado, e ao meu orientador Dr. Gustavo por todos os ensinamentos. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

O fruto desse trabalho só foi possível graça à ajuda de vocês que colaboraram de forma direta ou indireta na construção da tese. Mediante a isto gostaria de agradecer...

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar com sabedoria durante essa caminhada.

A Universidade Federal de Juiz de Fora eu deixo meu agradecimento profundo. Obrigada pela oportunidade de um ensino de qualidade e gratuito, por disponibilizar todos os recursos e infraestrutura e me proporcionar o conhecimento necessário para concluir este trabalho.

Aos meus pais Renato e Edna pelo amor incondicional, por serem minha base e meu alicerce, meu ponto de equilíbrio e refúgio durante esses anos. Por serem os maiores encorajadores de todas minhas conquistas. A vocês todo meu amor e gratidão.

Aos meu irmão Renato Júnior e irmã Bruna, por me apoiarem, incentivarem e mesmo de longe estarem sempre presente no meu dia a dia. Obrigada por todo carinho, amor e compreensão ao longo desses anos. Amo muito vocês.

Ao Bruno, por toda a compreensão, carinho e momentos de alegrias que compartilhamos nesses anos. Obrigada por sempre pensar em formas de fazer essa caminhada mais leve e por ser essa pessoa ímpar e parceira.

A minha cunhada Tatiana e meu cunhado Wallace obrigada por sempre estarem prontos a ajudar e por todos os momentos de alegrias que compartilhamos nesses anos. Amo vocês.

Ao meu orientador professor Dr. Gustavo, agradeço por ter-me deixado fazer parte do seu grupo de pesquisa em 2011 como aluna de iniciação científica e ter acreditado em mim e nas minhas capacidades durante esses 11 anos. Quero de uma forma imensa, expressar o meu muito obrigada... por tudo. Pela forma paciente e generosa com que sempre me incentivou e ajudou, e pelo estímulo sentido após cada conversa, conversas que muitas das vezes relacionadas as incertezas e inseguranças do mundo acadêmico ou simplesmente sobre vida. Agradeço ainda pelo profissionalismo e o trato simples, correto e científico, com que sempre abordou as nossas reuniões de trabalho. Gustavo você é uma pessoa ímpar e um orientador excepcional, nunca dúvidas disso. Tenho um imenso carinho e admiração pela sua pessoa. Espero que continuemos trabalhando juntos nessa nova caminhada. Obrigada tudo!

Ao meu coorientador Dr. Diego pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram esse trabalho e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Aos professores Dr. Antônio, Celly e Dr. Luiz Fernando por tantos ensinamentos e apoio que contribuíram no desenvolvimento do trabalho. Obrigada!

Ao Dr. Tiago, pela confiança e oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao Prof. Dr. Erix, pela confiança e oportunidade de trabalharmos juntos.

Aos amigos e colegas de laboratórios, Gabriela, Débora, Aline, Diego, Paulo Henrique, Tatiana, Hudson, Patrícia, Bismark, Daphne, Rafael, Moyra, Kleber, Hugo, Álvaro, Francielly, Pedro, Linus que jamais sairão da minha memória os momentos ímpares e que muitas das vezes trouxeram conforto e alegria. É um ciclo que se encerra e a saudade já está intensamente presente! Obrigada por compartilharem bons momentos, angústias, conhecimentos... e deixar essa caminhada mais leve e serena. Torço pelo sucesso de todos!

Aos amigos Raony, Alessandro, Tamires, Rodrigo e Nayton, pelos diversos momentos de descontração e por todo apoio durante esses anos. Tenho um carinho imenso por vocês e torço muito pelo sucesso de todos!

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFJF, pela oportunidade de realização do presente trabalho.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFJF pelo apoio de material e pelo auxílio financeiro nas realizações dos trabalhos do grupo. Um agradecimento especial a agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro no mestrado e doutorado, sem a qual seria ainda mais difícil concluir essa etapa.

Aos funcionários de serviços gerais, que contribuíram nas limpezas e organizações dos laboratórios. Obrigada!

RESUMO

A presente tese aborda o estudo da geração *hot spots* eficientes usando ácido 4-mercaptopbenzoico (4-HMB) para induzir a formação de agregados de AgNP através da junção molecular do grupo carboxila de 4-HMB adsorvido em diferentes AgNP pelo grupo tiol no intuito de aumentar a sensibilidade SERS para obter espectros em limite de concentração de $3,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. Também foi investigado se a seletividade de adsorção de corantes catiônicos e aniônicos em AgNP é promovida pelas interações eletrostáticas em SM-SERS. Trabalhou-se com AgNP esféricas estabilizadas por íons BO₃⁻ por não apresentarem assinaturas vibracionais na mesma região dos analitos em estudo. Para a inferência de SM-SERS utilizando a microscopia Raman confocal, o volume confocal provado pelo espectrômetro Raman foi determinado para radiação incidente 632,8 nm e 785 nm. A concentração de amostra para a ocorrência SM foram $1,59 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e $2,72 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹ para abertura confocal 50×1000 μm e para 25×1000 μm a concentração é $4,35 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e $2,36 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹, respectivamente nas linhas laser em 632,8 nm e 785 nm. Os estudos SM-SERS e SERS foram realizados com radiação excitante 632,8 nm e abertura confocal 50×1000 μm em virtude da ressonância de plásmon de superfície localizada das AgNP. O 4-HMB, ligado à AgNP por uma ligação tiol-Ag, foi capaz de desencadear a agregação de AgNP via ligação de hidrogênio entre grupo carboxila de 4-HMB adsorvido em diferentes AgNP em pH=4, abaixo do pK_a=4,79 do grupo carboxila. Os agregados de AgNP foram formados a partir das estruturas diméricas de 4-HMB adsorvidas em diferentes AgNP, AgNP-(4-HMB)₂-AgNP. Como ferramentas para caracterização dos AgNP-(4-HMB)₂-AgNP foram usadas técnicas de espectroscopia UV-VIS, DLS e SERS. Cálculo baseado em DFT do modelo Ag₄-(4-HMB)₂-Ag₄ foi realizado para comparação entre os espectros SERS calculados para a estrutura monomérica de 4-HMB adsorvida em Ag do modelo [4-HMB-Ag₄] e experimentais. Foi possível distinguir as duas estruturas pela observação do modo vibracional ν(CO) em 1682 cm⁻¹ do 4-HMB-Ag₄ que muda para 1604 cm⁻¹ com a formação dos Ag₄-(4-HMB)₂-Ag₄. Não foi observada abaixo de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a assinatura vibracional do 4-HMB adsorvida nas AgNP em pH acima do pK_a, entretanto, em pH=4 o sinal é intensificado drasticamente. A hipótese da intensificação SERS do 4-HMB ser devido à agregação de AgNP foi reforçada pela não observação do sinal SERS do 4-bromobenzenotiol (4-BrBT) a $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A detecção SM-SERS de 4-HMB foi demonstrada experimentalmente e os resultados foram associados a um maior número de *hot spots* formados. Além disso, foram analisados quatro corantes que diferem pela carga total. Os espectros SERS dos corantes catiônicos (Rodamina-6G e Cristal violeta) foram obtidos no

regime SM ($3,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹). Nesse regime, são observadas flutuações de intensidades SERS, associada a ausência do corante catiônico na região de *hot spots* e de *hot spots* no volume confocal. Os corantes aniônicos (IR-820 e vermelho do Congo) não apresentaram sinal SERS em concentrações inferiores $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Os resultados indicaram que a interação eletrostática do corante com a superfície da Ag foi dominante para o desempenho SERS.

Palavras-Chave: SM-SERS. 4-HMB. Ligação de hidrogênio. Corantes.

ABSTRACT

This thesis addresses the study of efficient hot spot generation using 4-mercaptobenzoic acid (4-HMB) to induce the formation of AgNP aggregates through the molecular coupling of the carboxyl group of 4-HMB adsorbed on different AgNP by thiol group to increase SERS sensitivity to obtain spectra at a concentration limit of 3.0×10^{-9} mol L⁻¹. We also investigated whether the selectivity of adsorption of cationic and anionic dyes on AgNP is promoted by electrostatic interactions on SM-SERS. We worked with spherical AgNP stabilized by BO³⁻ ions because they do not present vibrational signatures in the same region of the analytes under study. For the inference of SM-SERS using confocal Raman microscopy, the confocal volume probed by the Raman spectrometer was determined for incident radiation 632.8 nm and 785 nm. The sample concentration for the occurrence of SM was 1.59×10^{-9} mol L⁻¹ and 2.72×10^{-11} mol L⁻¹ for the confocal aperture 50×1000 μ m and for 25×1000 μ m the concentration is 4.35×10^{-10} mol L⁻¹ and 2.36×10^{-11} mol L⁻¹, respectively in the laser lines at 632.8 nm and 785 nm. The SM-SERS and SERS studies were performed with exciting radiation 632.8 nm and confocal aperture 50×1000 μ m due to localized surface plasmon resonance of AgNP. The 4-HMB, linked to AgNP by a thiol-Ag bond, was able to trigger AgNP aggregation via H-bond between the carboxyl group of 4-HMB adsorbed on different AgNP at pH=4, below pK_a=4.79 of the carboxyl group. AgNP aggregates were formed from the dimeric structures of 4-HMB adsorbed on different AgNP, AgNP-(4-HMB)₂-AgNP. As tools for the characterization of AgNP-(4-HMB)₂-AgNP, UV-VIS, DLS, and SERS spectroscopy techniques were used. DFT-based calculation of the Ag₄-(4-HMB)₂-Ag₄ model was performed for comparison between the SERS spectra calculated for the monomeric structure of 4-HMB adsorbed on Ag of the 4-HMB-Ag₄ model and experimental. We saw two structures by observing the vibrational mode $\nu(\text{CO})$ at 1682 cm^{-1} of 4-HMB-Ag₄, which changes to 1604 cm^{-1} with the formation of Ag₄-(4-HMB)₂-Ag₄. It was not observed below 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ the vibrational signature of 4-HMB adsorbed on AgNP at pH above pK_a, however, at pH=4 the signal is drastically intensified. The hypothesis that SERS enhancement of the 4-HMB is due to AgNP self-assembly triggered by 4-HMB H-bonds was reinforced by the non-observation of the SERS signal of 4-bromobenzenethiol (4-BrBT) at 5.0×10^{-7} mol L⁻¹. Detection of 4-HMB by SM-SERS was experimentally demonstrated and the results were associated with a greater number of hot spots formed. In addition, four dyes that differ in total charge were analyzed. The SERS spectra of the cationic dyes (Rhodamine-6G and Crystal Violet) were obtained in the SM regime (3.0×10^{-9} mol L⁻¹). In this regime, fluctuations in SERS intensities are observed, associated with the

absence of cationic dye in the region of hot spots and hot spots in the confocal volume. The anionic dyes (IR-820 and Congo red) did not show SERS signal at concentrations lower than $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. This indicated that the electrostatic interaction of the dye with the Ag surface was dominant for the SERS performance.

Keywords: SM-SERS. 4-HMB. H-bonds. dyes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação esquemática dos mecanismos de espalhamento inelástico (Stokes, anti-Stokes e Raman ressonante) e elástico (Rayleigh).....	23
Figura 2-	Esquema do fenômeno de ressonâncias plásmons de superfície localizadas-LSPR.	27
Figura 3-	(a) Parte real da constante dielétrica $\epsilon_1\omega$, (b) parte imaginária da constante dielétrica $\epsilon_2\omega$ em função do comprimento de onda e (c) fator de qualidade de diferentes metais.	31
Figura 4-	Distribuição do campo elétrico para (a) nanopartícula isolada e (b) um dímero de nanopartículas; (c) fator intensificação do campo elétrico local de um dímero AuNP em função da distância interpartículas.....	32
Figura 5-	Diagrama ilustrativo da intensificação SERS pelo mecanismo químico em que mostra interação eletrônica da molécula com as NP.	34
Figura 6-	Ilustração dos cenários de SM-SERS em contraste com método bi-analito em que se pode provar a sensibilidade do SM-SERS com espectros puro do (a) BTZ, (b) R-6G e (c) de ambos os analitos em concentrações maiores.....	37
Figura 7-	Esquema do mecanismo de agregação controlada e micrografia TEM das cadeias alternadas de bipirâmide-nanosfera.	39
Figura 8-	(a) Ilustração do volume confocal na amostra padrão de silício. (b) No plano focal em $Z=0$, A é representada por um traço a área confocal; representada por H a altura confocal no eixo axial ($+Z$, $-Z$).....	47
Figura 9-	Esquema para obtenção dos espectros SERS de 4-HMB em diferentes concentrações. $[X]$ corresponde a concentração de 4-HMB a ser utilizada para obtenção dos espectros SERS.....	48
Figura 10-	Esquema para obtenção dos espectros SERS de corantes em diferentes concentrações. $[X]$ corresponde a concentração de corantes a ser utilizada para obtenção dos espectros SERS.....	49
Figura 11-	Forma de luz formada pela lente objetiva do microscópio Raman.	52
Figura 12-	Perfil da profundidade da intensidade Raman para a intensidade integrada da banda em $521,5\text{ cm}^{-1}$ de uma amostra padrão de silício em função do deslocamento axial (-200 a $200\text{ }\mu\text{m}$) do estágio motorizado.....	53

Figura 13-	(a) Mapeamento Raman obtido pelo deslocamento lateral dos espectros Raman da amostra padrão de Si e (b) Perfil da Intensidade da banda Raman em $521,5 \text{ cm}^{-1}$ da amostra padrão de silício em função do deslocamento lateral.	54
Figura 14-	Ilustração esquemática do equilíbrio químico em relação ao pH.	58
Figura 15-	Estruturas otimizadas e a evolução da energia de ligação dos clusters de prata em função do tamanho dos clusters.	60
Figura 16-	Geometria otimizada da molécula 4-mercaptobenzoico na forma (a) monômero e do (b) dímero. As estruturas foram caracterizadas como mínimos locais de energia potencial no mesmo nível de teoria.	61
Figura 17-	Espectros Raman teóricos do 4-mercaptobenzoico monômero e dímero.	62
Figura 18-	Superfície de potencial eletrostático molecular e cargas atômicas pontuais do íon 4-mercaptbenzóico (a) dímero e (b) monômero.	64
Figura 19-	Comparação entre os espectros SERS teórico do monômero de 4-HMB adsorvido em diferentes tamanhos cluster de Ag.	66
Figura 20-	Geometria otimizada para o agregado de Ag_4 automontado por 4-HMB.	66
Figura 21-	Comparação entre (a) espectro SERS teórico da estrutura independente Ag_4 -(4-HMB) e (b) espectro SERS teórico do agregado automontado ($[\text{Ag}_4\text{-(4-HMB)}]_2\text{-Ag}_4$); (c) Espectro Raman do 4-HMB sólido e (d) espectro SERS médio experimental de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 4-HMB em $\text{pH}=4$. A inserção mostra um zoom na faixa de $1750\text{-}1550 \text{ cm}^{-1}$ do espectro em (d). As frequências calculadas são representadas com um $\text{FWHM}= 4 \text{ cm}^{-1}$	67
Figura 22-	Espectro de extinção para as AgNP utilizando o redutor citrato de sódio.	71
Figura 23-	Distribuição de tamanho das AgNP medida por (a) DLS e; (b) micrografia eletrônica de varredura das AgNP.	72
Figura 24-	(a) Espectro de extinção para as AgNP utilizando o redutor boroidreto de sódio e (b) DLS da suspensão de coloidal.	73
Figura 25-	Espectros SERS obtidos da suspensão coloidal (a) sem centrifugação e (b) dois ciclos de centrifugação.	75
Figura 26-	Espectro do substrato SERS na proporção 1:1 v:v (coloide de Ag : água) em $\text{pH}=4$	76
Figura 27-	(a) Espectro de extinção do AgNP comparado ao 4-HMB $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ adsorvido em AgNP e após a adição de $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($(\text{AgNP}(4\text{-HMB})_2\text{AgNP})$) para ajustar o pH para 4 e (b) evolução do espectro UV-VIS de 4 -HMB ($5,0 \times 10^{-7}$	

	mol L ⁻¹) adsorvido em AgNP após a adição de 50,0 µL de HCl 0,1 mol L ⁻¹ em função do tempo.	78
Figura 28-	(a) AgNP de diâmetro de 30 nm foram obtidas a partir do ajuste de comprimento de onda de ressonância versus diâmetro por simulação via eletrodinâmica clássica usando a TMG e (b) simulação dos espectros de extinção para diferentes agregados formados aleatoriamente por AgNP de 30 nm.	79
Figura 29-	Evolução dos espectros UV-Vis do 4-HMB (5,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹) adsorvido em AgNP após a adição de 50,0 µL de HCl 0,1 mol L ⁻¹ em função do tempo.	80
Figura 30-	Espectro de extinção de AgNP comparado aAgNP após a adição de 5 µL de HCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH=4).....	81
Figura 31-	Distribuição de tamanho de AgNP em função da concentração de 4-HMB obtida a partir da análise DLS comparado com resultado obtido para AgNP sem qualquer adição de 4-HMB. O tamanho médio medido é representado em cada análise. ...	82
Figura 32-	Comparação entre o espectro SERS médio experimental de 4-HMB 5,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em (a) pH=4 e (b) pH=6 (sem adição de HCl).....	83
Figura 33-	Dependência do sinal SERS médios de 4-HMB adsorvidos em AgNP em pH=9, 6 e 4.....	84
Figura 34-	Distribuição de tamanho de AgNP medidos por DLS em pH=9, 6 e 4, respectivamente. O tamanho médio medido é representado em cada análise.	85
Figura 35-	Espectros SERS médio de 4-HMB na concentração de 5,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ com a adição de KCl e HCl em concentrações equivalentes de íons cloreto 2,5 mmol L ⁻¹ . A 2,5 mmol L ⁻¹ dos íons cloreto é correspondente ao ajuste de pH=4.	86
Figura 36-	Espectros SERS médios de 4-BrBT no regime de concentração (a) 1,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ e (b) 5,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ . Inseto da Figura 35(a) mostra a estrutura química do 4-BrBT.	88
Figura 37-	2000 espectros SERS obtidos do 4-HMB no regime de (a) 32 moléculas e (b) 2 moléculas contida no volume confocal; Espectros SERS médios correspondentes (c) 32 moléculas e (d) 2 moléculas.	89
Figura 38-	Representação de 5 espectros SERS individuais selecionados de 2000 espectros obtidos para moléculas de 4-HMB 5,0×10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ em pH=4.....	91
Figura 39-	Simulação das intensidades SERS no centro hot spot para 1000 eventos gerados de agregados aleatório com diferentes distribuições de nanopartículas; normalmente distribuídos com média µ=2, 4 ou 6 nanopartículas.	92

Figura 40- Espectros de extinção das AgNP e da mistura 1:1 de 4-HMB ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) /AgNP no tempo de 0h e 24h.....	94
Figura 41- Espectro SERS médio do 4-HMB em pH=4 no regime de (a) 2; (b) 3; (c) 4; (d) 5 e 10 moléculas de 4-HMB. A concentração no volume confocal é: 3×10^{-9} mol L ⁻¹ (2 moléculas), $4,5 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹ (3 moléculas), 6×10^{-9} mol L ⁻¹ (4 moléculas); $7,5 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹ (5 moléculas); $1,5 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹ (10 moléculas).	95
Figura 42- Espectros puros das componentes recuperadas pela análise de MCR-ALS obtidos dos espectros SERS experimentais de 4-HMB no regime (a) 2; (b) 3; (c) 4; (d) 5 e (e) 10 moléculas contidas no volume confocal.....	97
Figura 43- A contribuição de dois componentes que mostram a variação na intensidade Relativa das bandas 1588 cm ⁻¹ e 1076 cm ⁻¹ dos espectros SERS experimentais de 4-HMB no regime (a) 2; (b) 3; (c) 4; (d) 5 e (e) 10 moléculas oriunda da Figura 41.	98
Figura 44- Fórmulas estruturais do (a) vermelho do Congo, (b) IR-820, (c) cristal violeta e (d) rodamina 6G.	100
Figura 45- Espectros eletrônico de solução aquosa de (a) vermelho do Congo, (b) rodamina 6G, (c) IR-820 e (d) cristal violeta em concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	101
Figura 46- 1500 espectros SERS do CV obtidos no tempo de aquisição 0,1 s em concentrações de estudos (a) 3×10^{-6} mol L ⁻¹ e (b) 3×10^{-9} mol L ⁻¹	102
Figura 47- Histogramas da intensidade SERS normalizadas para as concentrações (a) $3,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ e (b) $3,0 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹	104
Figura 48- (a) 1500 espectros SERS obtido com tempo de aquisição 0,1 s e (b) espectro SERS médio do corante IR-820 na concentração 3×10^{-6} mol L ⁻¹	105
Figura 49- 1500 espectros SERS da R6G no regime de concentração (a) 3×10^{-6} mol L ⁻¹ e (b) 3×10^{-9} mol L ⁻¹ obtido com tempo de aquisição 0,1 segundos e (c) e (d) seus espectros SERS médio, respectivamente.....	106
Figura 50- (a) 1500 espectro SERS individuais e (b) médio do vermelho do Congo na concentração de 3×10^{-6} mol L ⁻¹	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	As coordenadas atômicas da estrutura otimizada do complexo modelo [Ag ₄ -(4-HMB) ₂ -Ag ₄].	44
Tabela 2-	Valores das H _{confocal} , A _{confocal} e as concentrações no regime de uma única molécula determinada através do volume confocal para linha laser em 632,8 nm utilizando as aberturas confocais 50×1000 μm e 25×1000 μm.	56
Tabela 3-	Valores das H _{confocal} , A _{confocal} e as concentrações no regime de uma única molécula determinada através do volume confocal para linha laser em 785 nm utilizando as aberturas confocais 50×1000 μm e 25×1000 μm.	57
Tabela 4-	Energia absoluta dos cluster de prata Ag ₂ a Ag ₁₀ e energia de ligação. N é o número de átomos de prata.	59
Tabela 5-	Números de onda Raman (dados em cm ⁻¹) e atribuições das bandas Raman para o 4-HMB (monômero e dímero, como indicado) calculados no nível de teoria DFT, B3LYP/6-31++G(d,p).	63
Tabela 6-	Bandas Raman (em cm ⁻¹) e atribuição vibracional para os espectros Raman e SERS do sólido 4-HMB e 4-HMB-AgNPs (5,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) em pH=4. Os espectros SERS simulados e as atribuições para o complexo [Ag ₄ -(4-HMB) ₂ -Ag ₄] calculados no nível CAM-B3LYP/6-31++G(d,p) também são apresentados.	68
Tabela 7-	Coordenadas atômica da estrutura Ag ₂ .	119
Tabela 8-	Coordenadas atômica da estrutura Ag ₄ .	119
Tabela 9-	Coordenadas atômica da estrutura Ag ₆ .	119
Tabela 10-	Coordenadas atômica da estrutura Ag ₈ .	120
Tabela 11-	Coordenadas atômica da estrutura Ag ₁₀ .	120
Tabela 12-	Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag ₂ -4-HMB.	121
Tabela 13-	Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag ₄ -4-HMB.	122
Tabela 14-	Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag ₆ -4-HMB.	123
Tabela 15-	Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag ₈ -4-HMB.	124
Tabela 16-	Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag ₁₀ -4-HMB.	125

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E DE SÍMBOLOS

SERS	Espalhamento Raman intensificado por superfície – da sigla em inglês <i>surface-enhanced Raman scattering</i>
SM	Molécula única- da sigla em inglês <i>Single Molecule</i>
NP	Nanopartículas plasmônicas
LSPR	Ressonâncias plasmônicas de superfície localizadas – da sigla em inglês <i>localized surface plasmon resonance</i>
HOMO	Orbital ocupado de maior energia – da sigla em inglês <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
LUMO	Orbital desocupado de menor energia – da sigla em inglês – <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
BTZ	Benzotriazol
DFT	Teoria do Funcional da Densidade – da sigla em inglês – <i>Density Functional Theory</i>
VEDA 4	Análise de Distribuição de Energia Vibracional.
4-HMB	Ácido 4-mercaptopbenzoico
EL	Energia de ligação
4-BrTF	4-bromobezenotiol
DLS	Espalhamento dinâmico de luz – da sigla em inglês - <i>dynamic light scattering</i>
TMG	Teoria de Mie generalizada
VC	Vermelho do Congo
CV	Cristal violeta
R6G	Rodamina 6G
MCR-ALS	Método de Resolução de Curva Multivariada por Mínimos Quadrados Alternados - da sigla em inglês - <i>Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares)</i>
v-	Estiramento
δ-	Deformação no plano
τ-	Deformação fora do plano
m-	Monômero
d-	Dímero

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	ESPECTROSCOPIA RAMAN	23
1.2	O EFEITO DE ESPALHAMENTO RAMAN INTENSIFICADO POR SUPERFÍCIE-SERS	26
1.2.1	<i>Mecanismo Eletromagnético</i>	26
1.2.2	<i>Mecanismo Químico</i>	33
1.3	ESPALHAMENTO RAMAN INTENSIFICADO POR SUPERFÍCIE DE UMA ÚNICA MOLÉCULA	35
2	OBJETIVOS	40
2.1	OBJETIVO GERAL	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3	METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO	42
3.1	REAGENTES	42
3.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA ESFÉRICAS DE Ag.....	42
3.2.1	<i>Síntese baseada no estudo reportado por Lee e Meisel (1982)</i>	42
3.2.2	<i>Síntese baseada no estudo reportado por Creighton e colaboradores (1979)</i>	43
3.3	DETALHES COMPUTACIONAIS	43
3.4	SIMULAÇÕES ELETRODINÂMICAS CLÁSSICAS VIA TEORIA GENERALIZADA DE MIE.....	45
3.5	DETERMINAÇÃO DO VOLUME CONFOCAL	46
3.6	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	47
3.6.1	<i>Preparo do substrato SERS utilizando ácido 4-mercaptobenzoico</i>	47
3.6.2	<i>Preparo dos experimentos SERS para os corantes</i>	48
3.7	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS	49
3.7.1	<i>Espectroscopia de absorção no UV-VIS</i>	49
3.7.2	<i>Espectroscopia Raman</i>	49
3.7.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	50
3.7.4	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz</i>	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1	DETERMINAÇÃO DO VOLUME CONFOCAL	51
4.1.1	<i>Determinação do perfil confocal</i>	51

4.1.2	<i>Conclusões parciais</i>	57
4.2	ESTUDO ESPECTROSCÓPICO TEÓRICO PARA A MOLÉCULA 4-HMB	57
4.2.1	<i>Estabilidade de pequenos clusters de prata</i>	58
4.2.2	<i>Espectros Raman teóricos</i>	60
4.2.3	<i>Espectros SERS do ácido 4-mercapbenzoico adsorvido no cluster Ag₄</i>	65
4.2.4	<i>Conclusões parciais</i>	70
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE PRATA	71
4.3.1	<i>Caracterização das AgNP</i>	71
4.3.2	<i>Conclusões parciais</i>	73
4.4	SERS DE UMA ÚNICA MOLÉCULA	73
4.4.1	<i>Caracterização do problema na obtenção do espectro SM-SERS</i>	74
4.4.2	<i>Estudos para verificar a formação de agregados automontados induzidos pela estrutura dimérica de 4-HMB</i>	77
4.4.3	<i>Estudo da obtenção dos espectros SERS do 4-HMB no regime de uma ou poucas moléculas</i>	88
4.4.4	<i>Conclusões parciais</i>	98
4.5	OBTENÇÃO DO ESPECTRO SERS DE CORANTES NO REGIME DE UMA OU POUCAS MOLÉCULAS	100
4.5.1	<i>Conclusões parciais</i>	107
5	CONCLUSÕES	108
5.1	PERSPECTIVAS FUTURAS	109
	REFERÊNCIAS	111
	ANEXO A - Coordenadas atômica das estruturas otimizadas.	119
	ANEXO B - Apresentação em congressos	126
	ANEXO C - Artigos e capítulos de livros publicados	127

1 INTRODUÇÃO

A espectroscopia Raman foi demonstrada experimentalmente pela primeira vez por Chandrasekhara Venkata Raman em 1928 (RAMAN; KRISHNAN, 1928) e baseia-se no espalhamento inelástico da luz. A técnica consiste na interação da radiação eletromagnética monocromática com a matéria, que acarreta a perturbação das moléculas para um estado mais energético, ou seja, um estado intermediário e que, ao retornar ao estado fundamental poderá espalhar um fóton com energia igual, maior ou menor à da radiação incidente (SALA, 2008). O estado para o qual o elétron vai após a excitação não necessariamente é um estado de energia possível de ser ocupado no material. Por isso esse estado intermediário é chamado de estado virtual. A espectroscopia Raman tem como um dos principais objetivos obter informações sobre as ligações químicas presentes e estrutura molecular, já que a diferença de energia entre a radiação excitante e a espalhada corresponde à energia de transições vibracionais. Entretanto, o espalhamento Raman apresenta limitações por possuir baixa seção de choque (*ca.* 10^{-29} cm^2 molécula^{-1} sr^{-1}) (AROCA, 2006), o que a torna inviável para estudos de monocamadas moleculares em superfícies devido à baixa densidade de moléculas adsorvidas. Outra técnica vibracional bastante empregada para estudos das estruturas e a reatividade em superfície é a espectroscopia de absorção no infravermelho. Apesar de possuir uma seção de choque alta (*ca.* 10^{-21} cm^2 molécula^{-1} sr^{-1}) (AROCA, 2006), a alta absortividade da água na região espectral de interesse inviabiliza a análise de analitos em soluções aquosas. Apesar da baixa seção de choque, há algumas vantagens em utilizar a espectroscopia Raman em relação a espectroscopia de absorção no infravermelho, como por exemplo, as amostras não precisam passar por pré-tratamentos complexos; além disso, a água não interfere fortemente nas assinaturas vibracionais do analito, permitindo a análise em soluções aquosas.

O espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS- acrônimo de *surface-enhanced Raman scattering*) foi observado pela primeira vez em 1974 por Fleischmann, Hendra e McQuillan no estudo da adsorção de piridina sobre eletrodos de prata, contornando as limitações das espectroscopia Raman (FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974). O trabalho tinha como desafio demonstrar que a espectroscopia Raman tinha capacidades semelhantes à espectroscopia no infravermelho para o estudo de adsorbatos moleculares sobre superfícies sólidas. Para aumentar a sensibilidade da espectroscopia Raman, os autores aumentaram a rugosidade do eletrodo de prata através de ciclos de oxirredução e atribuíram a observação das bandas Raman características da piridina ao aumento da área superficial do eletrodo, que aumentaria o número de moléculas disponíveis para o espalhamento inelástico.

Dessa forma, foi observada a potencialidade da espectroscopia Raman para análise de superfície.

O efeito da intensificação SERS só foi reconhecido em 1977 por dois grupos independentes (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977; JEANMAIRE; VAN DUYNÉ, 1977), que mostraram que a alta intensidade Raman observada não podia ser atribuída apenas ao número de espalhadores presentes na superfície do eletrodo. A intensificação do sinal obtida foi ($\sim 10^6$) enquanto a intensificação esperada devido ao aumento na rugosidade do eletrodo era ($\sim 10^2$) (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977; JEANMAIRE; VAN DUYNÉ, 1977), o que levou à proposta da existência de um mecanismo paralelo envolvido na observação dos espectros Raman da piridina sobre eletrodos rugosos. Atualmente, são utilizados dois mecanismos para elucidar o efeito SERS: mecanismo eletromagnético (CIALLA et al., 2010) e o mecanismo químico (CORIO et al., 1999). Para o mecanismo eletromagnético, a intensificação SERS é atribuída principalmente às ressonâncias de plásmons de superfície localizadas (LSPR- acrônimo de *localized surface plasmon resonance*) (CAO; SUN; GRATAN, 2014), que podem atingir até 8 ordens de magnitude ou valores ainda mais altos em regiões de campo eletromagnéticos fortemente confinados, conhecidos como “*hot spots*” (LEE et al., 2011). A formação dos *hot spots* é dada pelo acoplamento do plásmon de superfície de diversas nanopartículas plasmônicas (NP) se estiverem a distâncias da ordem de poucos nanômetros. A presença de *hot spots* melhora ainda mais a eficiência de intensificação do espalhamento Raman pelo efeito SERS, o que permite a detecção de uma única molécula por SERS (SM-SERS) no volume sondado pelo laser (DOS SANTOS; TEMPERINI; BROLO, 2016, 2019; KNEIPP et al., 1997; NIE; EMORY, 1997). Já o mecanismo químico pode adicionar até 2 ordens de magnitude à intensificação pelo efeito SERS (CORIO et al., 1999). É importante notar que as interações químicas entre o metal e a molécula alteram o tensor de polarizabilidade Raman da molécula de interesse. Conseqüentemente, o mecanismo químico pode levar a discrepâncias entre os espectros Raman e SERS, que permitem que se estude também a forma e intensidade das interações metal-adsorbato.

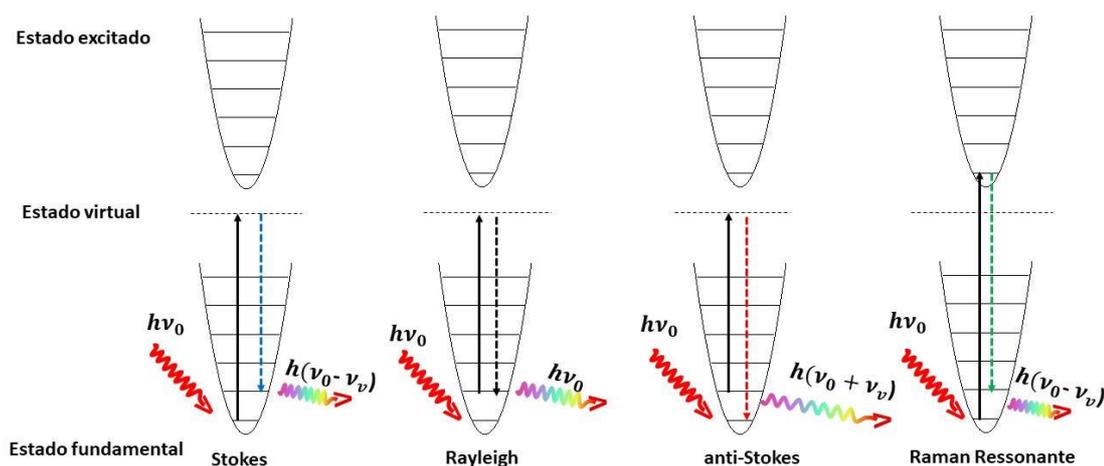
Desde a descoberta do efeito SERS vem crescendo drasticamente sua aplicação em inúmeras áreas, devido ao seu poder como ferramenta para detecção sensível e específica de moléculas adsorvidas em superfícies de nanopartículas plasmônicas (NP) (geralmente Ag, Au e Cu para lasers no visível) (FAN; ANDRADE; BROLO, 2020; LI et al., 2021). Nas próximas seções serão apresentados alguns aspectos relevantes do espalhamento Raman, do efeito SERS e da possibilidade de observar uma única molécula utilizando o efeito SERS que servirão de base para a discussão dos resultados obtidos nessa tese.

1.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Apesar das espectroscopias no infravermelho e Raman extraírem informações vibracionais, os processos físicos envolvidos são distintos. A espectroscopia no infravermelho é baseada na absorção do fóton para causar uma transição vibracional, enquanto, o Raman é embasado no espalhamento inelástico do fóton para causar outra transição, mas envolvendo os mesmos estados vibracionais. Nesta tese trabalharemos apenas com fenômeno de espalhamento inelástico, ou efeito Raman, ao qual daremos enfoque nesse tópico.

A interação da radiação eletromagnética monocromática com a matéria acarreta na perturbação das moléculas para um estado mais energético (estado virtual) como ilustrado na Figura 1 (SALA, 2008). Ao retornar ao estado fundamental os fótons espalhados podem se manifestar de três formas: espalhamento elástico, conhecido com espalhamento Rayleigh, no qual o fóton espalhado possui frequência igual à da radiação incidente (ν_0) e o espalhamento inelástico, chamados de espalhamentos Raman, nos quais o fóton espalhado tem frequência diferente da radiação incidente (ν_v), e que podem ser anti-Stokes e Stokes (SALA, 2008).

Figura 1- Representação esquemática dos mecanismos de espalhamento inelástico (Stokes, anti-Stokes e Raman ressonante) e elástico (Rayleigh).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

No espalhamento anti-Stokes (em que a molécula encontra-se em um estado vibracional excitado quando interage com o fóton), a frequência espalhada é maior que a frequência da radiação incidente, assim a radiação espalhada inelasticamente possuirá maior energia que a radiação incidente (SALA, 2008). Já no espalhamento Stokes, a frequência espalhada é menor que a frequência da radiação incidente, ou seja, a radiação espalhada possuirá menor energia.

A diferença de energia entre o fóton incidente e o fóton espalhado é a energia de uma transição vibracional, e a intensidade do espalhamento Raman pode ser associado ao momento de dipolo induzido (\vec{P}) na molécula pela radiação. O momento de dipolo induzido pode ser descrito pela Equação 1.

$$\vec{P} = \vec{E} \alpha$$

Equação 1

Nessa equação, α corresponde à polarizabilidade, que é a medida de quão deformável é a nuvem eletrônica molecular na presença do campo elétrico incidente (\vec{E}). O espalhamento Raman só será observado se houver a variação da polarizabilidade com as vibrações moleculares em torno da geometria de equilíbrio (deformação da nuvem eletrônica) frente à perturbação da radiação incidente. Dessa forma, para a observação de uma banda Raman associada a um modo vibracional, a polarizabilidade deve variar com a coordenada vibracional da molécula (q_v) em torno da posição de equilíbrio, como descrito na Equação 2.

$$\left(\frac{d\alpha}{dq_v} \right)_0 \neq 0$$

Equação 2

A polarizabilidade pode ser expressa como uma série Taylor em função da coordenada vibracional, tal que (SALA, 2008):

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq_v} \right)_0 q + \dots$$

Equação 3

Onde $\left(\frac{d\alpha}{dq_v} \right)_0$ é a derivada do tensor de polarizabilidade com o modo vibracional, calculada na posição de equilíbrio, q_v é a coordenada normal do v -ésimo modo vibracional, α_0 é tensor de polarizabilidade da molécula na geometria de equilíbrio. Na Equação 3 os termos de maior ordem podem ser desprezados devido a pequena variação da coordenada.

Considerando que a coordenada q e o campo \vec{E} descrito por:

$$q = q_0 \cdot \cos(2\pi\nu_v t)$$

Equação 4

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cdot \cos(2\pi\nu_0 t)$$

Equação 5

Sendo ν_0 e ν_v , respectivamente, a frequência da radiação incidente e da radiação vibracional, \vec{E}_0 é a amplitude máxima do campo eletromagnético da radiação incidente e t é o tempo. Substituindo na Equação 1 as Equações 4 e 5 e utilizando da identidade trigonométrica, $\cos(a) \cdot \cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a + b) + \cos(a - b)]$, chega-se na Equação 6.

$$\vec{P} = \vec{E}_0 \alpha_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq_v} \right)_0 q_{v0} \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \}$$

Equação 6

Na Equação 6 o primeiro termo descreve o espalhamento Rayleigh, enquanto, o segundo e terceiro termos descrevem o espalhamento anti-Stokes (luz espalhada com maior energia que a incidente ($\nu_0 + \nu_v$)) e Stokes (espalhamento com menor energia ($\nu_0 - \nu_v$)).

Diferente do espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes fora da condição de ressonância, nos quais a energia do fóton de excitação é bem menor que a energia do primeiro estado eletrônico excitado da molécula, para o efeito Raman ressonante, a energia da radiação excitante coincide com a energia de uma transição eletrônica da molécula, estabelecendo uma condição de ressonância entre estados vibrônicos do estado eletrônico fundamental e excitado como ilustrado na Figura 1. O efeito Raman ressonante corresponde a um mecanismo de intensificação do espalhamento Raman; nessa condição, a intensidade das bandas Raman relacionadas aos modos vibracionais dos cromóforos pode ser intensificada por um fator de até 10^5 vezes (CLARK; DINES, 1986).

A intensidade da banda Raman pode ser descrita pela Equação 7 (KIEFER et al., 1995).

$$I_{\text{Raman}} = C I_0 (\nu_0 \pm \nu_v)^4 \sum_{i,j} |\alpha_{\rho\sigma}|^2_{i,j}$$

Equação 7

Onde I_0 é a intensidade da radiação incidente e C é uma constante que depende do sistema de unidades utilizado. Nota-se que a intensidade Raman tem uma dependência com o quadrado do tensor de polarizabilidade e a quarta potência da frequência espalhada Stokes e anti-Stokes (LONG, 2002; SALA, 2008).

A espectroscopia Raman é uma ferramenta poderosa no estudo e caracterização de moléculas. Entretanto, os sinais fracos causados pela baixa seção de choque para o efeito limitam o uso da espectroscopia Raman para alguns sistemas, como adsorção de monocamadas em superfícies e soluções diluídas. Uma das estratégias para contornar essa limitação através do aumento da intensidade Raman se tornou possível com a descoberta do efeito SERS em 1974 (FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974). O efeito SERS consiste em um processo em que sinais de espalhamento Raman de moléculas próximas a nanoestruturas de determinados materiais podem ser intensificados por meio da intensificação do campo eletromagnético local nas proximidades de uma NP, como será ressaltado na próxima seção.

1.2 O EFEITO DE ESPALHAMENTO RAMAN INTENSIFICADO POR SUPERFÍCIE-SERS

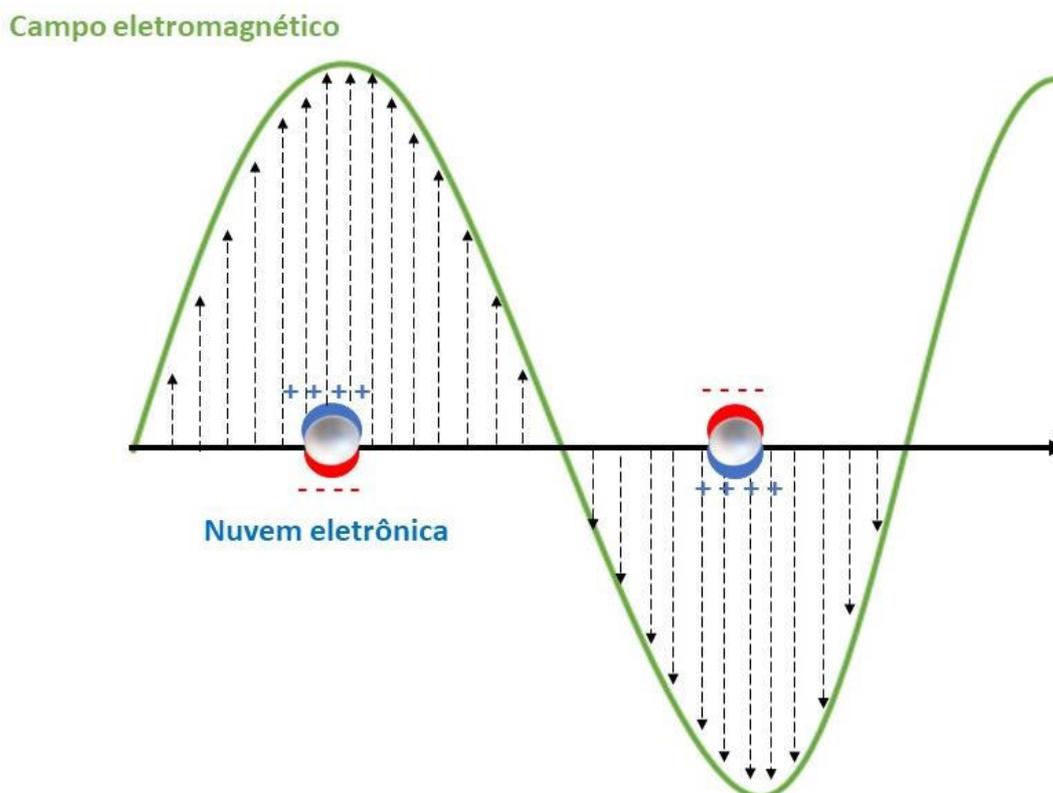
A intensificação do sinal Raman pela superfície de NP permite estudar a adsorção das moléculas em concentrações baixas, permitindo observar mesmo bandas fracas. Os metais de cunhagem Ag, Au e Cu são preferencialmente usados como substratos em função de gerarem altas intensificações SERS na região do visível (FAN; ANDRADE; BROLO, 2020; RODRIGUES; ANDRADE; TEMPERINI, 2013). Para a observação do sinal SERS, as NP devem ter dimensões em escala nanométrica (até cerca de 100 nm). Estes tamanhos de NP permitem a ressonância com o plásmon de superfície localizado na região do visível. Atualmente, o efeito SERS é descrito em função dos mecanismos eletromagnético (CIALLA et al., 2010) e químico (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977; CORIO et al., 1999) e atuam de formas distintas, como veremos abaixo.

1.2.1 Mecanismo Eletromagnético

Em 1977 Jeanmaire e Van Duyne (JEANMAIRE; VAN DUYNE, 1977) propuseram que o fator responsável pelo intensificação SERS é dado pelo aumento do campo elétrico local sobre a superfície metálica. Houve muito desenvolvimento posterior a essa primeira proposta e

nos dias atuais é denominado de mecanismo eletromagnético (DING et al., 2017; LE RU et al., 2008). O mecanismo eletromagnético é decorrente da LSPR e tem origem na interação da radiação eletromagnética incidente com uma NP menor que o comprimento de onda da luz, como esquematizado na Figura 2.

Figura 2- Esquema do fenômeno de ressonâncias plásmons de superfície localizadas-LSPR.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O campo eletromagnético interage com os elétrons da banda de condução da NP resultando em uma oscilação nos movimentos coletivos desses elétrons, dando origem a um dipolo induzido oscilante. A excitação coletiva relacionada a esta transição recebe o nome de plásmon de superfície localizado, que ocorre na ressonância entre a radiação excitante e esse modo de oscilação, caracterizando a LSPR. Em virtude da LSPR, é gerado um campo elétrico local intenso nas proximidades das NP (PETRYAYEVA; KRULL, 2011) que vem sendo intensamente estudado pelas espectroscopia de superfície (DOS SANTOS et al., 2009; FAN; ANDRADE; BROLO, 2011). Essa intensificação pode resultar em aumento do sinal Raman em 4 ordens de magnitude em NP isoladas (ZHANG et al., 2013).

O momento de dipolo induzido para uma NP esférica de raio a circundada por uma superfície homogênea, infinitamente grande, não absorvente e não magnético, com a função

dielétrica (ϵ_m) sob a irradiação eletromagnética, como esquematizado na Figura 2 pode ser descrito pela Equação 8 (MAIER, 2004; ZHANG et al., 2013). Nota-se que o momento dipolo induzido é diretamente proporcional à constante dielétrica, à intensidade do campo elétrico incidente e ao tensor de polarizabilidade.

$$\vec{P} = \epsilon_m \vec{E} \alpha$$

Equação 8

A polarizabilidade de uma NP esférica pode ser obtida através das aproximações quase-estáticas, e é dada pela Equação 9.

$$\vec{P} = 4\pi\epsilon_0 a^3 \frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m}$$

Equação 9

Onde ϵ_0 e $\epsilon(\omega)$ são a constante dielétrica do vácuo e a função dielétrica (dependente da frequência de excitação) do metal, respectivamente (ZHANG et al., 2013). O campo elétrico dentro da esfera pode ser demonstrado como constante e proporcional ao campo incidente, como mostra a Equação 10 (ETCHEGOIN, 2009; PILOT et al., 2019).

$$\vec{E}_{int} = \frac{3\epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m} \vec{E}_0$$

Equação 10

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega)$$

Equação 11

$$\epsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{1 + \omega^2\tau^2}$$

Equação 12

$$\varepsilon_2(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2 \tau}{\omega (1 + \omega^2 \tau^2)}$$

Equação 13

Onde \vec{E}_0 é o campo elétrico incidente, $\varepsilon_{(\omega)}$ é a constante dielétrica do metal expressa em função da frequência, que apresenta componentes real e imaginária, mostradas nas Equações 11 a 13, nas quais ε_1 e ε_2 são a parte real e imaginária da função dielétrica, respectivamente; τ é o tempo de relaxação do elétron livre; $\gamma = 1/\tau$ é o parâmetro de amortecimento (ZHANG et al., 2013).

Na relação que descreve o tensor de polarizabilidade na Equação 9, o denominador é a parte mais importante. A condição de ressonância surge quando o denominador tende a zero ($\varepsilon_{(\omega)} = -2\varepsilon_m$), resultando em uma polarizabilidade máxima e, conseqüentemente, a LSPR também é máxima. Assim, o campo elétrico dentro da esfera será máximo (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). A transição LSPR surge quando a parte imaginária $\varepsilon_{(\omega)}$ for aproximadamente zero e a parte real for $-2\varepsilon_m$. É interessante notar que a parte imaginária limita o quão intensa a ressonância pode ser. A frequência do campo elétrico está diretamente relacionada com as propriedades ópticas das NP e a condição de ressonância é responsável pelo fenômeno LSPR. Entretanto, existirão condições diferentes de ressonâncias para diferentes dimensões, formas e tamanhos das NP; além disso, a proximidade e magnitude do acoplamento entre os plásmons de NP adjacentes e orientação em que a intensificação do campo ocorre também afetam a LSPR (GRASSESCHI; DOS SANTOS, 2020; PETRYAYEVA; KRULL, 2011; SZUNERITS; SPADAVECCHIA; BOUKHERROUB, 2014; WEI; XU, 2013).

A sobreposição do campo aplicado e do momento de dipolo do centro da partícula é descrito pelo campo elétrico externo (\vec{E}_{out}), comumente conhecido como campo elétrico local das NP metálicas e ocorre na interface dos meios NP-dielétrico. O campo elétrico externo é outra consequência importante do efeito LSPR e pode ser expresso pela Equação 14 (ETCHEGOIN, 2009).

$$\vec{E}_{out} = \vec{E}_0 + \frac{3\hat{n}(\hat{n} \cdot \vec{P}) - \vec{P}}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_m} \frac{1}{r^3}$$

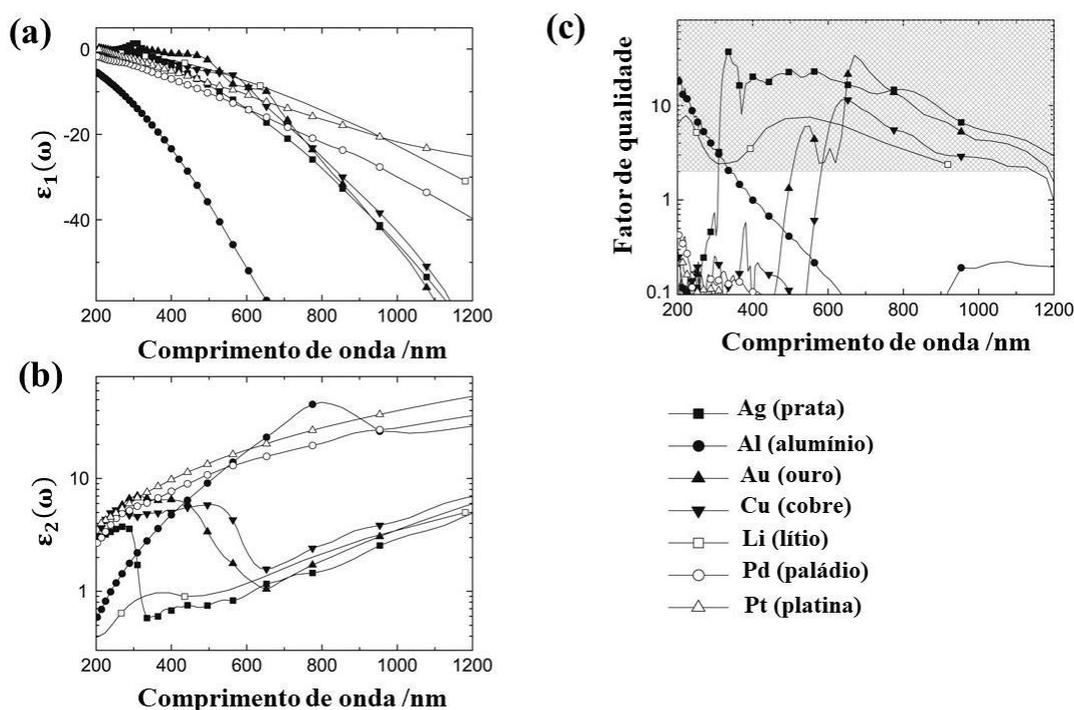
Equação 14

Onde \vec{P} é dipolo induzido na superfície da NP esférica, \hat{n} é o vetor unitário na direção do momento dipolo induzido, r é a distância do centro ao campo elétrico nas superfície das NP (MAIER, 2004). Nota-se pela Equação 14 uma intensificação resultante do campo elétrico local sobre o campo elétrico incidente. Além disso, verifica-se que o campo elétrico local tem uma dependência com distância do centro ao campo elétrico dada por $\frac{1}{r^3}$. Assim, o campo elétrico local se propaga na superfície e diminui rapidamente à medida que se afasta da superfície das NP. Esse campo elétrico aumentado é que atua no aumento de intensidade do espalhamento Raman no efeito SERS.

O interesse em trabalhar com os metais Au, Ag e Cu em SERS está associado às propriedades ópticas destes materiais, em virtude das funções dielétricas. A Figura 3 mostra valores experimentais de $\varepsilon_1(\omega)$ e $\varepsilon_2(\omega)$ em função do comprimento de onda de excitação para Ag, Al, Au, Cu, Li, Pd e Pt. Para que metais sejam consideradas bons substratos SERS, a parte real (relacionada ao espalhamento) da constante dielétrica deve possuir valor negativo e a parte imaginária (relacionada a absorção) valor pequeno e positivo. Observa-se na Figura 3(a) que Ag, Au, Cu e Al apresentam maior decaimento na região do visível para $\varepsilon_1(\omega)$, ou seja, apresenta valores mais negativos. Enquanto isso, na Figura 3(b) referente à parte imaginária, $\varepsilon_2(\omega)$, verifica-se que Ag, Au e Cu apresentam os menores valores positivos nessa mesma região espectral. As partes real e imaginária podem ser relacionadas entre si, através do conceito do fator de qualidade (Q). O fator Q em função do comprimento de onda desses metais são mostrados na Figura 3(c). Para utilizar esses metais como substratos SERS é imprescindível que o fator Q seja maior ou igual a 2 e preferencialmente acima de 10. Na região do visível, região em que as extensas maiorias das medidas SERS são realizadas, os metais Au, Ag e Cu apresentam um fator Q excelente. Entretanto, Ag, Au e Cu são bons substratos SERS para linhas de excitação com comprimentos de onda acima de 300, 500 e 600 nm, respectivamente. Vale ressaltar que o motivo pelo qual substratos de Ag são os que permitem as maiores intensificações SERS é por não apresentarem valores de contribuições de absorção apreciáveis acima de 300 nm (Figura 3(b)). Em estudos de SM-SERS, a detecção da assinatura vibracional da molécula está no limite do efeito SERS e há um interesse em trabalhar com substrato de Ag por viabilizar maiores intensificações SERS. Ainda mais, os sinais SERS só são observados quando a molécula está adsorvida quimicamente ou fisicamente em situação de *hot spots*, que exibem altos fatores de intensificação SERS, podendo alcançar 10^7 a 10^8 vezes. Os *hot spots* se caracterizam, em muitos casos, por duas NP (dímeros) próximas uma da outra, de maneira que

os modos LSPR interajam, provocando grandes intensificações do campo elétrico local (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

Figura 3- (a) Parte real da constante dielétrica $\varepsilon_1(\omega)$, (b) parte imaginária da constante dielétrica $\varepsilon_2(\omega)$ em função do comprimento de onda e (c) fator de qualidade de diferentes metais.

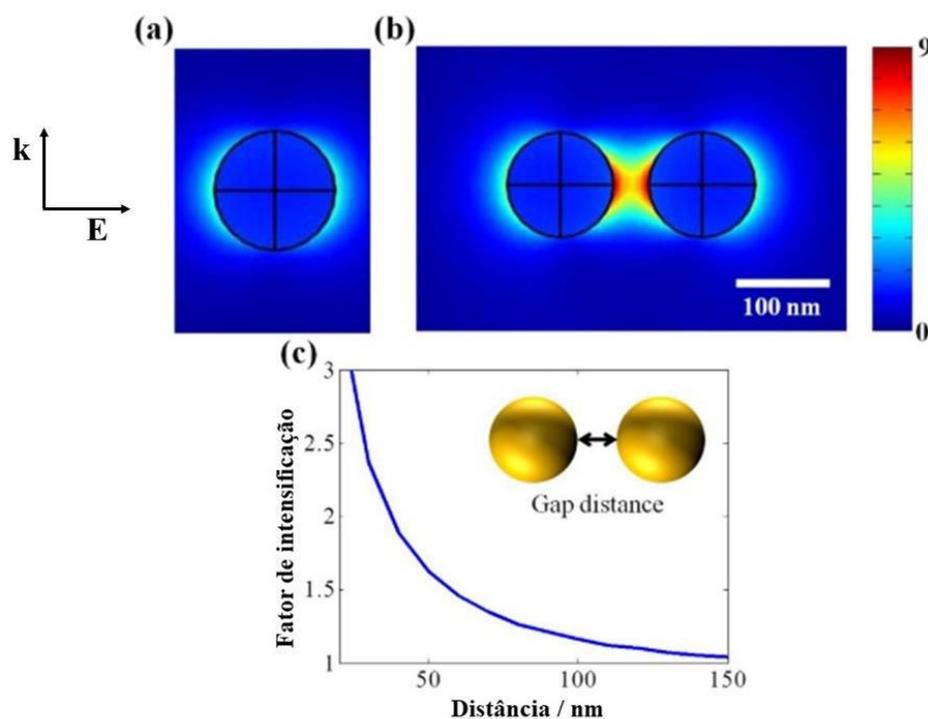


Fonte: Adaptado de Le Ru e Etchegoin (2009).

Na Figura 4 está representada a simulação da amplitude do campo elétrico gerado pela LSPR para uma AuNP (diâmetro de 100 nm) isolada ou para um dímero (*hot spot*), em relação ao campo eletromagnético incidente com $\lambda_0 = 633$ nm, em escala logarítmica, baseado em método de elementos finitos (CHUNG et al., 2011). A Figura 4(a) mostra a distribuição do campo elétrico local para a AuNP isolada, em que o campo é distribuído principalmente em ambos os lados da AuNP perpendicular à propagação da radiação incidente e atenua gradualmente com a distância em relação à AuNP. Os fatores de intensificação apresentados em algumas regiões próximas à AuNP isolada (regiões de maior concentração de campo) estão entre 10^3 e 10^4 vezes, porém é pequena em relação à Figura 4(b). A distribuição do campo elétrico local muda drasticamente quando há um dímero de AuNP próximas uma da outra (Figura 4(b)). O aumento do campo é muito maior na região de separação entre NP de um

dímero, podendo atingir valores de 10^9 vezes quando comparada a AuNP isoladas (CHUNG et al., 2011). Portanto, a adsorção das moléculas nessa região apresentaria uma intensificação SERS de magnitude muito mais alta do que as que não estivessem nela. Na Figura 4(b) nota-se que a intensidade do campo elétrico local decai rapidamente à medida que se afasta da região do eixo interpartículas (*hot spots*). Dessa forma, moléculas adsorvidas em diferentes pontos nessa região apresentarão fatores de intensificação diferentes, o que leva a flutuações na intensidade SERS.

Figura 4- Distribuição do campo elétrico para (a) nanopartícula isolada e (b) um dímero de nanopartículas; (c) fator intensificação do campo elétrico local de um dímero AuNP em função da distância interpartículas.



Fonte: Adaptado de Chung e colaboradores (2011).

A Figura 4(c) mostra o fator intensificação do campo elétrico local de um dímero AuNP, relacionando ao gap (distância interpartículas) entre elas. À medida que o gap entre as AuNP diminui, o aumento do campo elétrico local nos *hot spots* cresce consideravelmente rápido, implicando em maiores fatores de intensificação. O campo elétrico local gerado entre as duas NP é dependente da polarização da radiação incidente, que precisa ter componentes paralelas ao eixo interpartículas para que haja um fator de intensificação SERS alto (PILOT et al., 2019). Além disso, a intensificação SERS proporcionada por *hot spots* depende fortemente de uma

série de parâmetros, tais como: forma das NP, geometria dos agregados de NP, entre outros. Como consequência da configuração de *hot spots*, em estudos SERS apenas uma fração das moléculas adsorvidas em NP exibe altos fatores de intensificação, constituindo a fonte majoritária de sinal vibracional. Dessa forma, a detecção do sinal SERS no regime de uma SM pode ser obtida em tais pontos: em estado de NP agregadas por desestabilização de cargas superficiais (BLACKIE; LE RU; ETCHEGOIN, 2009; WANG et al., 2003) ou pela automontagem de dímeros plasmônicos ligados por analitos (DADOSH et al., 2009).

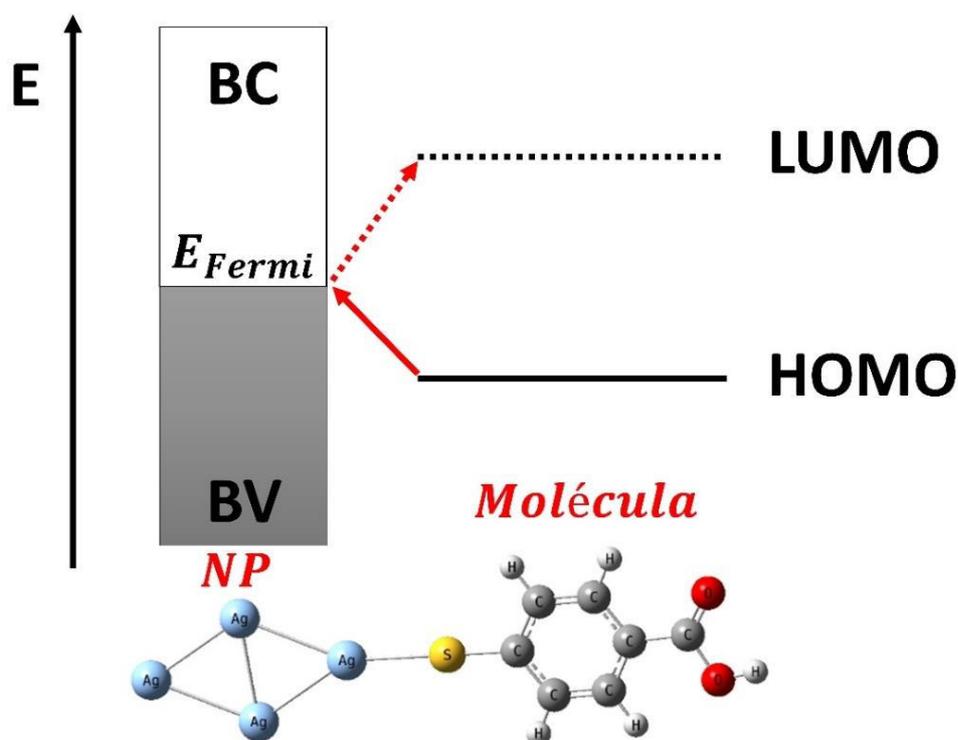
1.2.2 Mecanismo Químico

O mecanismo eletromagnético, embora seja o maior responsável pela intensificação SERS observada, não é a única contribuição. Os chamados mecanismos químicos podem adicionar até 2 ordens de magnitude à intensificação SERS (CORIO et al., 1999). Uma abordagem comum do mecanismo químico na literatura baseia-se na formação de um complexo de transferência de carga, em virtude das interações químicas entre a molécula espalhadora e a superfície das NP, alterando o tensor de polarizabilidade (α) Raman da molécula adsorvida. A intensificação SERS pelo mecanismo químico é altamente dependente da geometria e natureza química da molécula adsorvida (KAMBHAMPATI et al., 1998).

A Figura 5 ilustra um modelo simplificado da formação do acoplamento eletrônico entre AgNP e uma molécula formando um complexo metal-adsorbato que resulta no aumento da secção de choque da molécula adsorvida em função do acoplamento entre as bandas eletrônicas do metal e os orbitais moleculares. (KNEIPP et al., 2002). As AgNP consistem em níveis de energia contínuos, denominados banda de valência (BV) que são preenchidos até o nível de Fermi e acima do nível de Fermi os níveis eletrônicos são vazios, denominados de banda de condução (BC). Os orbitais moleculares HOMO (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) são o orbital ocupado de maior energia e o desocupado de menor energia da molécula adsorvida, respectivamente. O nível de Fermi das AgNP encontra-se entre os estados HOMO e LUMO do adsorbato. Assim, quando uma radiação excitante estiver em ressonância pode acarretar a transição de transferência de carga dos elétrons presentes no nível Fermi do metal para o orbital molecular LUMO da molécula, ou de elétrons no HOMO da molécula para o nível de Fermi, resultando em uma maior intensificação Raman nos dois casos. A formação do complexo NP-molécula pode gerar variações no espectro SERS em relação ao espectro Raman do adsorbato,

principalmente mudanças na posição e na intensidade relativa das bandas em relação à solução, o que não é explicado pelo mecanismo eletromagnético.

Figura 5- Diagrama ilustrativo da intensificação SERS pelo mecanismo químico em que mostra interação eletrônica da molécula com as NP.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Como resultado dos dois mecanismos de intensificação, a intensidade SERS pode ser escrita como mostrado na Equação 15. A intensificação SERS descrita pela Equação 15 é análoga à intensidade Raman. Os dois primeiros termos do lado direito da equação, associados à intensidade do campo elétrico, referem-se ao mecanismo eletromagnético, que atua sobre os campos incidente e espalhado, já o mecanismo químico atua sobre tensor de polarizabilidade. Dessa forma, a intensificação SERS é dada pela combinação dos dois mecanismos independentes e de efeito multiplicativo, sendo difícil distinguir a magnitude da contribuição de cada um separadamente, já que dependem conjuntamente das propriedades químicas, ópticas e da natureza da interação da NP-molécula.

$$I(\text{SERS}) = C |\vec{E}_0|^2 |\vec{E}_v|^2 (\nu_0 - \nu_v)^4 \sum_{i,j} |\alpha_{\rho\sigma}|^2_{i,j}$$

Equação 15

Sendo \vec{E}_0 e \vec{E}_v são respectivamente o campo eletromagnético da radiação incidente e espalhada. A intensificação do espalhamento Raman resulta em uma extrema sensibilidade e o fato de tratar de uma técnica vibracional dá uma especificidade intrínseca ao efeito SERS, que já teve demonstrada há cerca de 25 anos a possibilidade de estudar moléculas individuais, como discutido na próxima seção.

1.3 ESPALHAMENTO RAMAN INTENSIFICADO POR SUPERFÍCIE DE UMA ÚNICA MOLÉCULA

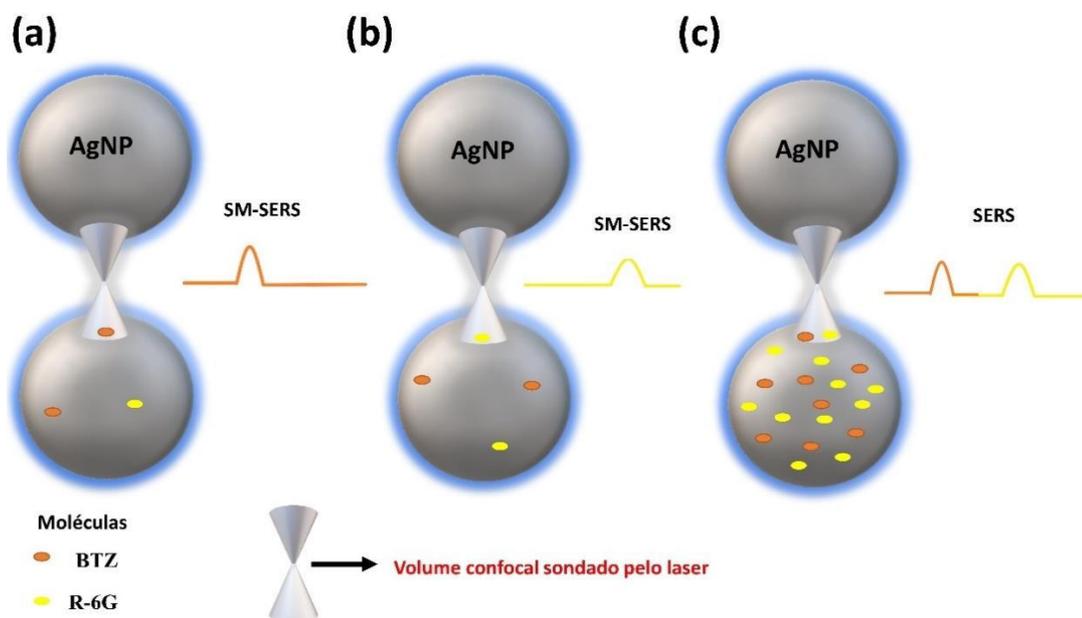
Em 1997, em trabalhos distintos Nie e Emory (NIE; EMORY, 1997) e Kneipp e colaboradores (KNEIPP et al., 1997), renovaram o interesse pelo efeito SERS ao demonstrar a sensibilidade do efeito para detecção de uma única molécula, ou SM-SERS. A obtenção do sinal SM-SERS resumia-se na ideia do preparo de uma solução diluída em concentrações ultrabaixas para que houvesse no volume analisado pelo laser uma única molécula; assim, o sinal observado seria devido a essa molécula. Em concentrações ultrabaixas não existem moléculas suficientes para formar uma monocamada na superfície das NP e muito menos estarem adsorvidas em todos os *hot spots*, alcançando o regime de SM. Nie e Emory (1997) prepararam soluções de concentrações ultrabaixas (2×10^{-10} mol L⁻¹) de rodamina 6G (R6G) e tomaram o fato de que as assinaturas vibracionais Raman da substância são observáveis como prova da sensibilidade SM-SERS. Por outro lado, Kneipp e colaboradores (KNEIPP et al., 1997) analisaram as estatísticas de intensidade dos eventos SM-SERS para o cristal violeta. Basearam sua análise em uma sequência de 100 espectros, cuja intensidades foram agrupadas e plotadas em um histograma. Os picos de intensidade exibiriam a probabilidade de observação em que as moléculas participam, sendo o evento com zero moléculas o mais provável. Posteriormente, utilizando uma amostragem muito maior de espectros, variando entre 1000 e 10000, foi demonstrado que o comportamento das intensidades SERS poderia ser descrita por uma distribuição de Pareto (ETCHEGOIN; MEYER; LE RU, 2007).

Posterior à descoberta do sinal SM-SERS, vários grupos realizaram estudos na abordagem de concentrações ultrabaixas de diversas substâncias (ETCHEGOIN et al., 2003; MICHAELS; JIANG; BRUS, 2000; SHARAABI; SHEGAI; HARAN, 2005; SHEGAI; HARAN, 2006; WEISS; HARAN, 2001). Contudo, havia um certo questionamento na obtenção do sinal SERS pela comunidade acadêmica, uma vez as condições de preparação e obtenção dos espectros apresentavam algumas dificuldades experimentais, como o pouco

domínio sobre o verdadeiro número de moléculas adsorvidas no volume confocal estudado e o preparo das diluições em concentrações ultrabaixas já que estas estão sujeitas a erros (por exemplo: adsorção da molécula na parede do recipiente). Nesse contexto, a abordagem chamada de bi-analito SERS surgiu e contornou esses questionamentos.

Le Ru e colaboradores desenvolveram a técnica do bi-analito, que se baseia no uso de dois analitos ao mesmo tempo em solução para obter os espectros SERS (LE RU; MEYER; ETCHEGOIN, 2006). Os autores usaram as substâncias R6G e benzotriazol (BTZ) em AgNP, já que os dois apresentam assinaturas vibracionais distintas e não interagem fortemente entre si. Os espectros SERS médios, obtidos de um conjunto de 1000 espectros com tempo de integração de 0,2 segundos da mistura dos analitos (100 nmol L^{-1} cada um), concentração em que muitas moléculas poderiam estar adsorvidas nas AgNP, exibiram a assinatura vibracional de ambos os analitos (Figura 6(c)). Apesar da R6G apresentar secção de choque 4 vezes maior que o BTZ nessas condições, o que não é ideal para comparação, o resultado permite quantificar claramente os sinais mistos. Para concentrações da ordem de SM-SERS, praticamente todos os eventos positivos possuíam apenas o sinal de um dos analitos, se o analito tiver contido nos *hot spots*, o que indica que apenas uma molécula estava sendo analisada por vez, em média, como ilustrado nas Figura 6(a) e (b). Em casos em que os analitos não estão presentes nos *hot spots* o evento é considerado nulo e não são observadas bandas Raman mensuráveis nos espectros, apenas ruídos espectrais. Pouco tempo depois, Dieringer e colaboradores utilizaram R6G e R6G deuterada, que apresentavam secções de choque iguais, para um experimento de bi-analito e mostraram que a proposta original se mantinha inalterada nessa condição (DIERINGER et al., 2007). Observar no regime de concentrações ultrabaixo das misturas dos analitos espectros SERS puros é uma prova da natureza dos sinais SERS no regime de SM (BLACKIE et al., 2008).

Figura 6- Ilustração dos cenários de SM-SERS em contraste com método bi-analito em que se pode provar a sensibilidade do SM-SERS com espectros puro do (a) BTZ, (b) R-6G e (c) de ambos os analitos em concentrações maiores.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

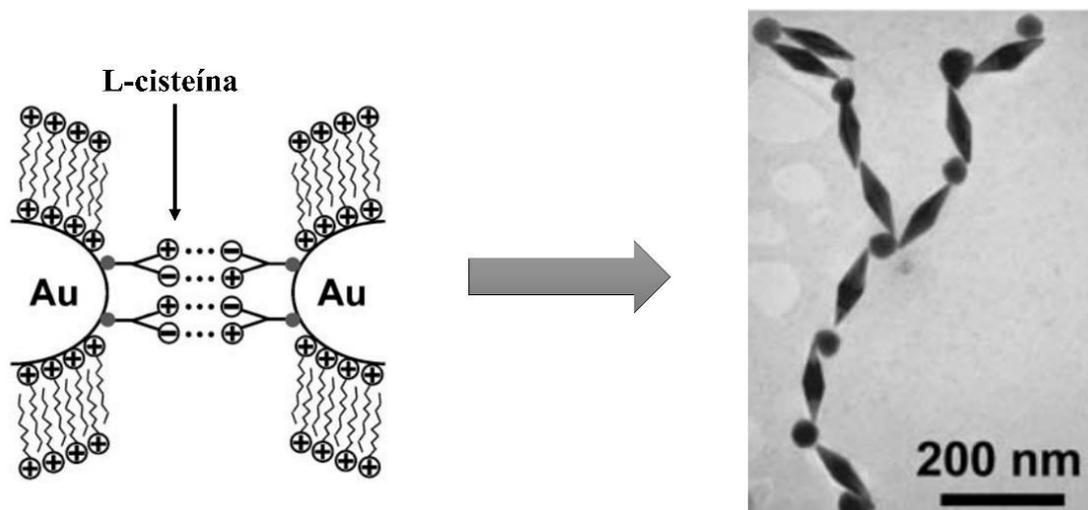
Desde a descoberta do SM-SERS, um grande número de grupos de pesquisas tem se dedicado ao desenvolvimento de NP capazes de detectar sinais SERS no nível SM (DIERINGER et al., 2007; KNEIPP et al., 1998; MOSKOVITS et al., 2007; SANTOS; TEMPERINI; BROLO, 2016; ZRIMSEK et al., 2017). Até o momento, a observação do sinal SM-SERS foi principalmente a partir de moléculas de corante adsorvidas em nanopartículas em diferentes configurações (CAÑAMARES et al., 2008; DOS SANTOS; TEMPERINI; BROLO, 2016). Comumente, moléculas de corante são excitadas nas regiões ressonantes ou pré-ressonantes para aproveitar o aumento na intensidade fornecida por ressonâncias moleculares (BLACKIE et al., 2008; LE RU; MEYER; ETCHEGOIN, 2006). Os estudos com SM-SERS são comumente realizados em NP agregadas aleatoriamente por adição de um sal (geralmente, KCl). Normalmente, a concentração utilizada para pré-agregar NP é próxima a 10 mmol L⁻¹, o que é ideal para produzir grandes fatores de intensificação SERS em AgNP (DARBY; LE RU, 2014). No entanto, os espectros relatados normalmente exibem uma relação sinal-ruído média baixa.

Os sinais SM-SERS são muitas vezes associados a flutuações de intensidade tanto absoluta quanto relativa e mudanças na forma espectral, que podem ser atribuídas às configurações do arranjo das AgNP em constante mudança dentro do volume confocal em

decorrência do movimento browniano inevitável e não são necessariamente do sinal SERS de SM, tornando a sua interpretação complexa. Geralmente, os experimentos SM-SERS são difíceis de reproduzir, em decorrência da distribuição não uniforme de *hot spots* na amostra. Apenas uma pequena fração de moléculas adsorvidas (menos de 1 %) ocupa a região *hot spots* (FANG; SEONG; DLOTT, 2008). Assim, há uma baixa probabilidade de encontrar um número razoável de moléculas adsorvidas dentro de *hot spots*. Portanto, estratégias para obter *hot spots* reprodutíveis são de suma importância para melhorar a probabilidade de encontrar moléculas dentro dessas regiões de alto fator de intensificação.

Para melhorar a compreensão da dinâmica dos *hot spots*, uma estratégia baseada em moléculas bifuncionais, como o ácido mercaptopropiônico, L-cisteína ou glutamina, adsorvidas em nanobastões de ouro tem sido usada para induzir agregação controlada no intuito de modular as propriedades ópticas de nanopartículas dispersas em suspensão (SETHI; JOUNG; KNECHT, 2009; SUN et al., 2008). Uma variedade de estruturas agregadas foram reportadas com a molécula L-cisteína, incluindo cadeias de nanobastões e cadeias alternadas de bipirâmide-nanosfera (SUDEEP; JOSEPH; THOMAS, 2005; ZHANG et al., 2007). O mecanismo de formação dos agregados é simples, consiste na adsorção do grupo funcional tiol na superfície de Au por meio da ligação S-Au, deixando a extremidade com outro grupo funcional livre. O grupo funcional livre precisa ser sensível às condições da solução, como pH. A acidificação do meio (pH=1), abaixo do valor de pK_a faz com que os grupos amins sejam carregados positivamente e os grupos carboxilatos carregados negativamente, como ilustrado na Figura 7. Dessa forma, a acidificação do meio possibilita as interações eletrostáticas com suas contrapartes de carga oposta na ponta das AuNP adjacente induzindo agregados automontados. A micrografia TEM do sistema automontado indica que ocorreu uma adsorção preferencial da molécula bifuncional por uma das faces das bipirâmides de Au e que estas são montadas pelas pontas alternadamente com as nanoesferas. A molécula ácido mercaptopropiônico, que possui grupos tiol e carboxila mostra uma dependência relevante com pH, sendo capaz de induzir a agregação em nanobastões de Au através de ligações de hidrogênio do grupo carboxila em pH=3, valor abaixo do pK_a do ácido mercaptopropiônico.

Figura 7- Esquema do mecanismo de agregação controlada e micrografia TEM das cadeias alternadas de bipirâmide-nanosfera.



Fonte: Adaptado de Zhang e colaboradores (2007).

Os estudos mostrados acima, apesar de não ter aplicabilidade em SERS, podem ser bastante relevantes, principalmente em estudos de SM ou de poucas moléculas por SERS, visto que as moléculas bifuncionais estão centradas na região de maior campo elétrico local. Entretanto, a abordagem utilizada foi realizada em concentrações relativamente altas (aproximadamente $6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), bem acima do regime de SM. Ainda mais, as moléculas bifuncionais possuem baixa seção de choque Raman, o que pode ser interessante para verificar o limite de detecção SERS para esse tipo de molécula.

Do ponto de vista espectroscópico, a utilização de moléculas bifuncionais com seção de choque moderada e que apresentam a mesma sensibilidade em induzir a agregação controlada pela acidez do meio pode trazer informações importantes da geração de *hot spots* e melhorar o seu entendimento. Além disso, pode promover um alto desempenho dos substratos SERS em função da concentração de campo elétrico local gerado nesses arranjos NP, para detecção de SM. Após a discussão acima, o trabalho de doutoramento apresentado na presente tese envolveu a busca por condições ótimas para geração de *hot spots* eficientes para SM-SERS usando o ácido 4-mercaptopbenzoico como agente de agregação através da automontagem induzida por ligações de hidrogênio entre o ácido 4-mercaptopbenzoico adsorvido em diferentes AgNP. Também visou o estudo da interação por carga no equilíbrio de adsorção de corantes catiônicos e aniônico, como cristal violeta, rodamina 6G, vermelho do Congo e IR-820 que não tinham sido ainda estudados nessas condições.

2 OBJETIVOS

Nas seções 2.1 e 2.2 serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos, respectivamente desse trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

Induzir a formação de agregados de nanopartículas de Ag através das ligações de hidrogênio do grupo carboxila do ácido 4-mercaptopbenzoico adsorvido em diferentes AgNP em pH=4. Além disso, entender as interações específicas do ácido 4-mercaptopbenzoico e de corantes aniônico e catiônicos com superfície das AgNP e investigar as flutuações de intensidades nos espectros SERS em regime de concentração 3×10^{-9} mol L⁻¹.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) determinar o volume confocal do laser para inferência da concentração no regime de uma única molécula;
- b) sintetizar nanopartículas de prata em suspensões aquosas, para a obtenção de nanopartículas com transições LSPR em ressonância com as radiações excitantes em 632,8 nm;
- c) caracterizar por espectroscopia de absorção no UV-VIS-NIR das nanopartículas da LSPR tanto isoladas quanto com agregação induzida pelo ácido 4-mercaptopbenzoico;
- d) caracterizar por microscopia eletrônica de varredura as nanopartículas isoladas;
- e) estudar os limites de detecção em regime de concentração 3×10^{-9} mol L⁻¹ de ácido 4-mercaptopbenzoico e dos corantes IR-820, cristal violeta, rodamina-6G e vermelho do Congo através da técnica SERS;
- f) tratar estatisticamente os resultados para obtenção do fator de intensificação SERS local;
- g) induzir a automontagem de AgNP com a utilização do ácido 4-mercaptopbenzoico em diferentes meios, verificar por espalhamento dinâmico de luz e estudar o efeito no desempenho SERS em regime de molécula única;

- h) obter espectros SERS no regime de uma única molécula para o ácido 4-mercaptobenzoico usando o agente agregador KCl e comparar com a acidificação por HCl, mantendo a concentração de íons Cl^- iguais;
- i) obter espectros SERS no regime de uma única molécula para 4-bromobenzenotiol;
- j) obter o espectro vibracional calculado para ácido 4-mercaptobenzoico na forma monômero e do dímero;
- k) obter o espectro vibracional calculado para *cluster* de Ag automontados com dímero de 4-HMB.

3 METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO

Nas próximas seções serão descritos as sínteses de nanopartículas de Ag, bem como metodologia computacional, reagentes, instrumentação em geral, condições de análises SERS e a descrição do volume confocal.

3.1 REAGENTES

Foram utilizados nos procedimentos experimentais os reagentes: nitrato de prata (AgNO_3) (Sigma-Aldrich-99,999%), citrato trissódico (Sigma-Aldrich-99%), boroidreto de sódio (NaBH_4) (Fluka-99%), ácido 4-mercaptobenzoico (Aldrich, 99%), 4-bromobezenotiol (Aldrich, 95%), corante IR-820 (Sigma-Aldrich-80%), corante cristal violeta (Vetec->90%), corante rodamina-6G (Sigma-95%), corante vermelho do Congo (Merck->35%); todas as substâncias foram utilizadas como recebidas, sem purificações adicionais. As soluções foram preparadas usando água com resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$.

3.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA ESFÉRICAS DE Ag

Nas seguintes subseções serão apresentadas a descrição das sínteses de nanopartículas de Ag utilizadas para a execução do trabalho de doutoramento.

3.2.1 *Síntese baseada no estudo reportado por Lee e Meisel (1982)*

A suspensão coloidal de prata foi obtida pela redução do sal de prata por citrato trissódico. Inicialmente foi preparado 50,00 mL de uma solução aquosa de AgNO_3 0,009 % m/V em um balão de 2 bocas, que que foi aquecido até ebulição sob refluxo; posteriormente, foram adicionados 1,0 mL de uma solução aquosa de citrato de sódio 1,0 % m/V. O aquecimento foi mantido por aproximadamente 1 hora; após esse tempo foi notada a mudança de coloração no meio reacional de amarelado para acinzentado, característico da formação de AgNP esféricas de tamanho médio de 91 nm.

3.2.2 Síntese baseada no estudo reportado por Creighton e colaboradores (1979)

A suspensão coloidal de prata foi obtida pela redução do sal de prata por boridreto de sódio. Adicionou-se em um erlenmeyer 15 mL de solução aquosa $3,33 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de boroidreto de sódio. A solução foi levada para um banho de gelo sob agitação magnética. Posteriormente, foram gotejadas 5,0 mL de solução aquosa de AgNO₃ $7,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Ao fim da síntese foi notada a mudança de coloração no meio reacional de incolor para amarelo, característico da formação de AgNP esféricas de tamanho médio de 29 nm.

3.3 DETALHES COMPUTACIONAIS

O método computacional utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT-acrônimo de Density Functional Theory) foram baseados no trabalho de Ho e Lee (HO; LEE, 2015) para otimização da geometria e simulação dos espectros vibracionais Raman para o 4-mercaptobenzoico e SERS para o 4-mercaptobenzoico ligado a um *cluster* de Ag. Os cálculos DFT foram realizados utilizando o funcional híbrido de troca e correlação B3LYP(LEE; YANG; PARR, 1988), usando o programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). Os conjuntos de base usados para S, C, O e H foram 6-31++G(d, p), que incluiu função de polarização e função difusa para todos os átomos. Para o átomo de Ag, os conjuntos de base Lanl2DZ foram usados para descrever a valência e os elétrons da camada interna.

Para melhorar a descrição da transferência de carga (TC) envolvida no efeito SERS, foi utilizado o funcional CAM-B3LYP proposto por Yanai, Tew e Handy (TAWADA et al., 2004). Este funcional faz uso do Método de Atenuação de Coulomb (CAM) para modificar o funcional B3LYP e melhorar a descrição qualitativa dos processos de TC de longo alcance (DREUW; HEAD-GORDON, 2005). Em todos os cálculos, o protocolo de solvatação implícita IEF-PCM foi aplicado para contabilizar os efeitos do solvente (água). Essa função de base/método tem boa concordância com os resultados do SERS em condições ácidas (HO; LEE, 2015). As coordenadas atômicas da estrutura otimizada do complexo automontado por 4-HMB ([Ag₄-(4-HMB)₂-Ag₄]) (Figura 16) estão apresentadas na Tabela 1. As atribuições dos modos vibracionais foi realizada com o apoio do programa de Análise de Distribuição de Energia Vibracional, VEDA 4 (JAMRÓZ, 2013).

Tabela 1- As coordenadas atômicas da estrutura otimizada do complexo modelo [Ag₄-(4-HMB)₂-Ag₄].

	X	Y	Z
C₁	5.6051420	-0.6721180	1.6644390
C₂	5.2594700	0.6844570	1.7312970
C₃	3.9435920	1.0896960	1.5570090
C₄	2.9415970	0.1458610	1.3151630
C₅	3.2792040	-1.2094590	1.2508750
C₆	4.5934610	-1.6133410	1.4240910
H₇	6.0287920	1.4251840	1.9209390
H₈	3.6906580	2.1423660	1.6086060
H₉	2.5015360	-1.9415170	1.0634820
H₁₀	4.8461350	-2.6668600	1.3702460
C₁₁	1.5330990	0.5479770	1.1284220
O₁₂	0.6315170	-0.2767130	0.9344550
O₁₃	1.3055660	1.8427080	1.1833020
H₁₄	0.3221960	2.0418210	1.0493180
S₁₅	7.2796390	-1.2040710	1.9519720
C₁₆	-6.2120540	2.8404700	0.2736050
C₁₇	-5.8623450	1.4769190	0.2442800
C₁₈	-4.5459880	1.0685270	0.3758850
C₁₉	-3.5218300	2.0080780	0.5467110
C₂₀	-3.8544360	3.3683400	0.5805690
C₂₁	-5.1702590	3.7750980	0.4468080
H₂₂	-6.6363050	0.7259560	0.1180160
H₂₃	-4.3099520	0.0100740	0.3483180
H₂₄	-3.0671410	4.1027170	0.7131970
H₂₅	-5.4095720	4.8332610	0.4743030
C₂₆	-2.1192530	1.6000160	0.6927400
O₂₇	-1.1980860	2.4152850	0.8515630
O₂₈	-1.8996720	0.2997450	0.6448360
H₂₉	-0.9196720	0.0991390	0.7549820
S₃₀	-7.8692280	3.4123500	0.1111320

Ag31	8.7674300	0.3728400	0.5779310
Ag32	10.1219240	-0.4854190	-1.6638400
Ag33	7.9345630	-2.3552700	-0.2112610
Ag34	10.4301170	2.0480250	-0.7830180
Ag35	-8.8474140	-1.3775380	-0.2426790
Ag36	-9.3349430	1.4156160	-0.3334180
Ag37	-11.2991500	-0.3115960	-0.9098000
Ag38	-0.9098000	-2.9452950	0.3589430

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

3.4 SIMULAÇÕES ELETRODINÂMICAS CLÁSSICAS VIA TEORIA GENERALIZADA DE MIE

As simulações para NP esféricas isoladas ou agregadas foram baseadas na Teoria Generalizada de Mie (TGM) (RINGLER et al., 2008; XU, 1995) e foram realizadas em colaboração com o Dr. Diego .P. dos Santos, na Universidade Estadual de Campinas do Instituto de Química, Departamento de Físico-Química, em Campinas, SP. A função dielétrica do AgNP foi descrita pela compilação experimental de Jonhson e Christy (JOHNSON; CHRISTY, 1972) e as AgNP foram simuladas considerando as propriedades dielétricas da água. As simulações dos agregados de AgNP foram realizadas por uma geração aleatória de tamanhos de *clusters* de acordo com uma distribuição gaussiana com o tamanho médio dos *clusters* (N) variável e seu desvio padrão (σ). Para cada distribuição (descrita por N e σ), 1000 agregados foram gerados aleatoriamente para calcular o fator de intensificação SERS em *hot spots* e 100 agregados para o cálculo dos espectros de extinção. O gap que separa as superfícies de duas AgNP foi tomada como 1,56 nm (duas vezes o tamanho da molécula de 4-HMB (ZHANG et al., 2020)). Os fatores de intensificação SERS simulados foram transformados em intensidades SERS para correlação com os dados experimentais. A transformação foi realizada de acordo com Equação 16 (DOS SANTOS, 2020):

$$I_{\text{SERS}} = -1 + \frac{1}{F_0} \sum_i F_{\text{HS},i}^4$$

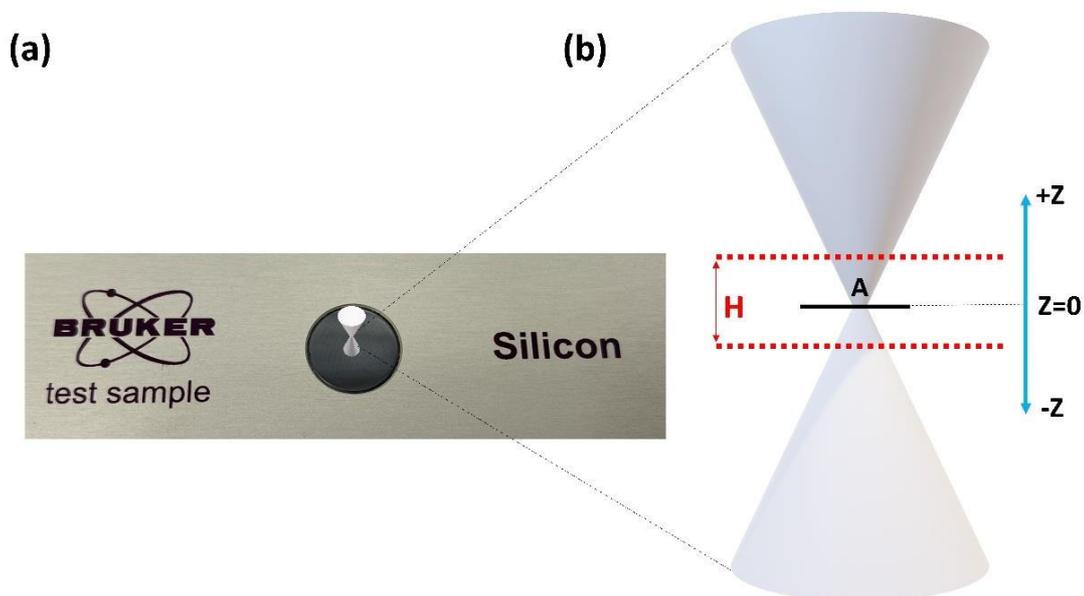
Equação 16

Onde $F_{HS,i}$ é o fator de intensificação SERS no i -ésimo *hot spots* gerado aleatoriamente em um agregado (agrupamento de AgNP), que foi calculado assumindo a aproximação E^4 (LE RU; ETCHEGOIN, 2006). F_0 é o fator de intensificação mínimo necessário para detecção de SM (definido como 1×10^8) (DOS SANTOS; TEMPERINI; BROLO, 2015; LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Para os eventos onde a Equação 16 retornou um valor negativo, I_{SERS} foi definido como zero, o que significa que a intensidade medida não seria suficiente para detecção.

3.5 DETERMINAÇÃO DO VOLUME CONFOCAL

Para sabermos a concentração a ser trabalhada no regime de uma SM, é necessário determinar o volume confocal analisado pelo laser. O volume confocal é caracterizado por duas grandezas independentes: a área iluminada pelo *spot* do laser e que é efetivamente coletada pelo espectrômetro (área confocal ($A_{confocal}$)) e a altura do cone de luz que efetivamente é provado ao passar pela fenda confocal do equipamento (altura confocal ($H_{confocal}$)) (ver Figura 8). Para a determinação dessas grandezas, fizemos uso de uma amostra padrão de silício, ilustrada na Figura 8(a). A altura confocal foi determinada variando ao longo do eixo axial a altura em relação ao plano focal $Z=0$ (representada na Figura 8(b)), em direção positiva, $+Z$, e negativa, $-Z$, e registrando a intensidade integrada da banda de silício em $521,5 \text{ cm}^{-1}$, resultando na altura confocal, H . Já a área confocal foi determinada registrando o espectro Raman através do mapeamento lateral no eixo X (representada na Figura 8(b) no plano focal em $Z=0$ por um traço em preto a secção linear utilizada para determinar a área confocal), que engloba a interface da amostra padrão de silício com uma região do suporte da amostra; a área foi determinada considerando o *spot* do laser como circular e utilizando a queda de intensidade na secção linear para determinar a área de um círculo com o diâmetro medido. Os detalhes da obtenção dessas grandezas estão demonstrados na seção 4.1. Os espectros foram adquiridos utilizando a radiação incidente 632,8 e 785 nm com potência incidente na amostra de 20 e 100 mW, respectivamente. Os dados experimentais foram obtidos com uma lente objetiva de magnificação de $50\times$ ($NA=0,51$) acoplada ao microscópio Raman Bruker SENTERRA, resolução de $3\text{-}5 \text{ cm}^{-1}$ na janela espectral e abertura da fenda confocal do espectrômetro de $25 \times 1000 \text{ }\mu\text{m}$ e $50 \times 1000 \text{ }\mu\text{m}$.

Figura 8- (a) Ilustração do volume confocal na amostra padrão de silício. (b) No plano focal em $Z=0$, A é representada por um traço a área confocal; representada por H a altura confocal no eixo axial ($+Z$, $-Z$).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções diluídas foram preparadas a partir de uma solução estoque de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para todas as substâncias. O preparo das soluções na concentração de poucas ou uma molécula foi realizada de acordo com o volume confocal determinado conforme procedimento descrito na seção 3.5.

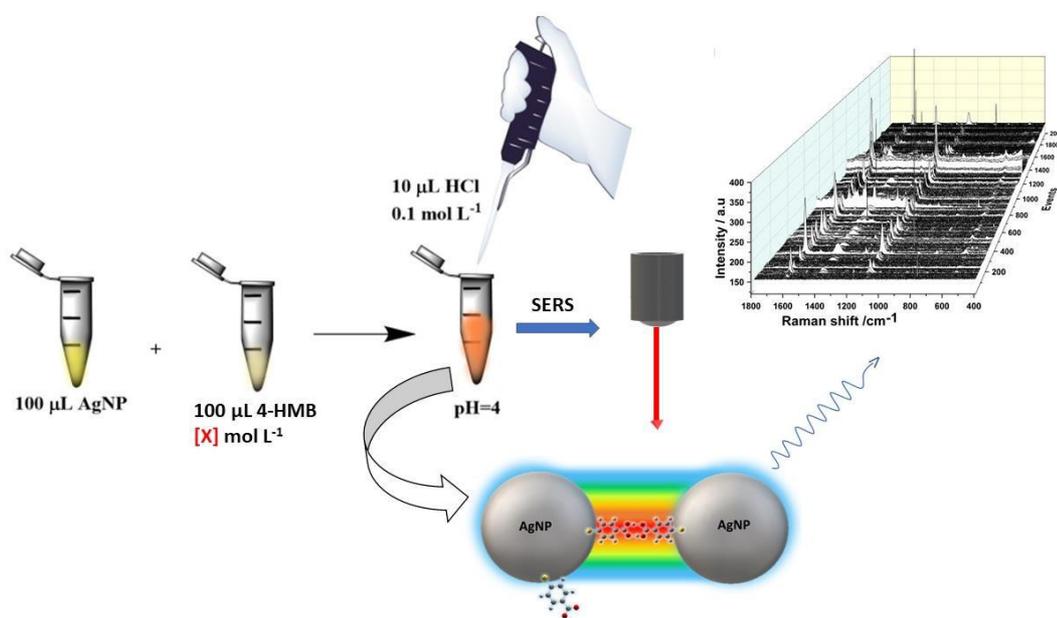
3.6.1 Preparo do substrato SERS utilizando ácido 4-mercaptobenzoico

Para minimizar a competição pela adsorção e difusão das moléculas foi utilizado o protocolo descrito por Darby e Le Ru (DARBY; LE RU, 2014), em que foi mantida a proporção 1:1 v:v (ácido 4-mercaptobenzoico: suspensão de Ag) das soluções para a preparação das amostras para os experimentos SERS.

A análise dos espectros SERS do ácido 4-mercaptobenzoico foi realizada a partir de soluções obtidas das soluções preparadas pela adição de $100 \mu\text{L}$ do coloide de Ag em $100 \mu\text{L}$ da solução de ácido 4-mercaptobenzoico em diferentes concentrações. A suspensão AgNP

misturada com uma solução de 4-HMB tinha pH=6. Posteriormente, foram adicionados 10 μL de uma solução aquosa de HCl 0,10 mol L⁻¹ para a acidificação do meio. Com a acidificação do meio, o pH foi de aproximadamente 4. O preparo das soluções para obtenção dos espectros SERS é representado na Figura 9.

Figura 9- Esquema para obtenção dos espectros SERS de 4-HMB em diferentes concentrações. [X] corresponde a concentração de 4-HMB a ser utilizada para obtenção dos espectros SERS.

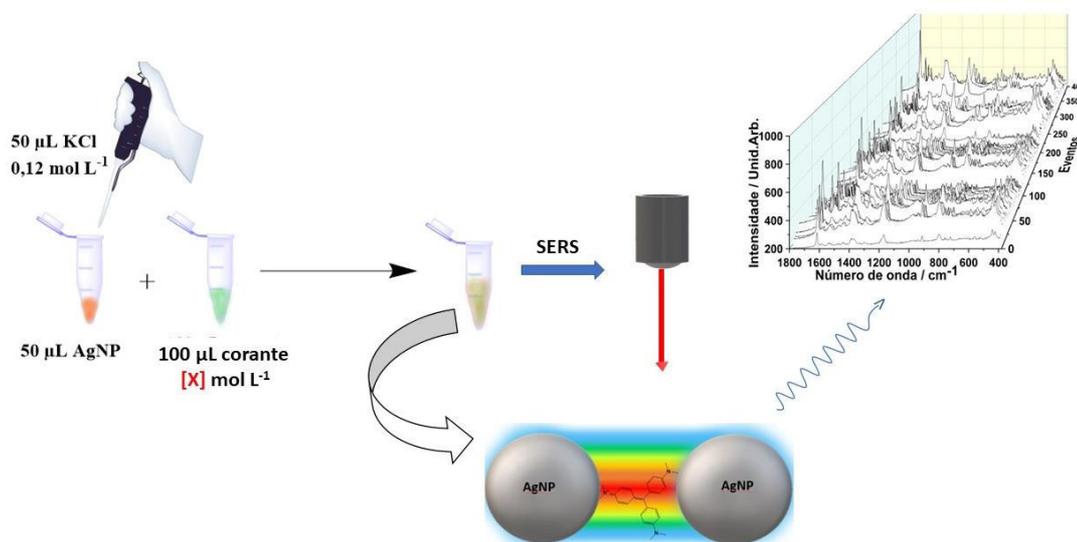


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

3.6.2 Preparo dos experimentos SERS para os corantes

O preparo das soluções para obtenção dos espectros SERS é representado esquematicamente na Figura 10. A análise dos espectros SERS utilizando corantes foi feita com a obtenção dos espectros de soluções obtidas adicionando 50 μL da suspensão coloidal de Ag em 50 μL da solução de KCl 0,12 mol L⁻¹. O KCl foi utilizado para pré-agregar a suspensão coloidal. Posteriormente, foram adicionados 100 μL das soluções de corante em concentrações diferentes.

Figura 10- Esquema para obtenção dos espectros SERS de corantes em diferentes concentrações. [X] corresponde a concentração de corantes a ser utilizada para obtenção dos espectros SERS.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

3.7 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS

A descrição dos equipamentos utilizados na caracterização dos nanopartículas de Ag e obtenção dos espectros SERS serão descritos nas seguintes seções.

3.7.1 Espectroscopia de absorção no UV-VIS

Os indícios da formação das AgNP foram através da existência da banda LSPR característica nos espectros no UV-VIS adquiridos em um espectrômetro Ocean Optics USB2000+ operando na região de 200 a 1100 nm. As análises das suspensões de AgNP foram realizadas utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm para a síntese da seção 3.2.1 e 5 mm para a síntese da seção 3.2.2. As suspensões não foram diluídas em relação ao resultado das sínteses para a obtenção dos espectros.

3.7.2 Espectroscopia Raman

As análises relativas à espectroscopia Raman foram realizadas utilizando um espectrômetro Raman dispersivo da Bruker, modelo SENTERRA. Para obtenção dos espectros

SM-SERS da molécula ácido 4-mercaptobenzoico e dos corantes, utilizou-se como radiação excitante a linha $\lambda_0 = 632,8$ nm de um laser HeNe, com a potência nominal do laser de 20 mW. A potência real do laser que chega na amostra é 9,07 mW. Os dados espectrais foram coletados usando uma lente objetiva de magnificação de 50× ULWD (NA= 0,51), resolução 3-5 cm^{-1} , fenda confocal 50×1000 μm e tempo de integração de 0,1 s. Os espectros SERS e SM-SERS foram obtidos através de um mapeamento Raman de 100 pontos (10×10) com a distância entre os pontos 0.000001 μm para simular a obtenção dos espectros no mesmo local. Para manter a suspensão coloidal no foco durante as análises, as medições iniciaram acima do plano focal Z=0 (ver seção 3.5) de forma que durante a aquisição dos espectros SERS o sinal total efetivo foi mantido.

3.7.3 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um microscópio eletrônico tipo *field emission gun* de marca FEI, modelo Magellan, utilizando uma tensão no filamento de 5 kV, com corrente de 10 μA , em colaboração com o Dr. Bráulio S. Archanjo, na Divisão de Metrologia de Materiais (DIMAT) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), em Duque de Caxias, RJ. Para preparar as amostras, a solução coloidal sintetizada foi gotejada sobre uma lâmina de silício, posteriormente seca a vácuo.

3.7.4 *Espalhamento Dinâmico de Luz*

As medidas de espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*, DLS) foram obtidas utilizando o instrumento Malvern modelo DLS Zeta Sizer Nano-ZS90. As análises das suspensões de Ag foram realizadas utilizando cubeta de vidro com quatro faces polidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas próximas seções serão apresentados os resultados obtidos nesse trabalho referente a determinação do volume confocal, o estudo espectroscópico teórico para a molécula 4-HMB, a caracterização das nanopartículas de prata e a obtenção dos espectros SERS em regime de uma única molécula para o 4-HMB e de corantes catiônicos e aniônicos.

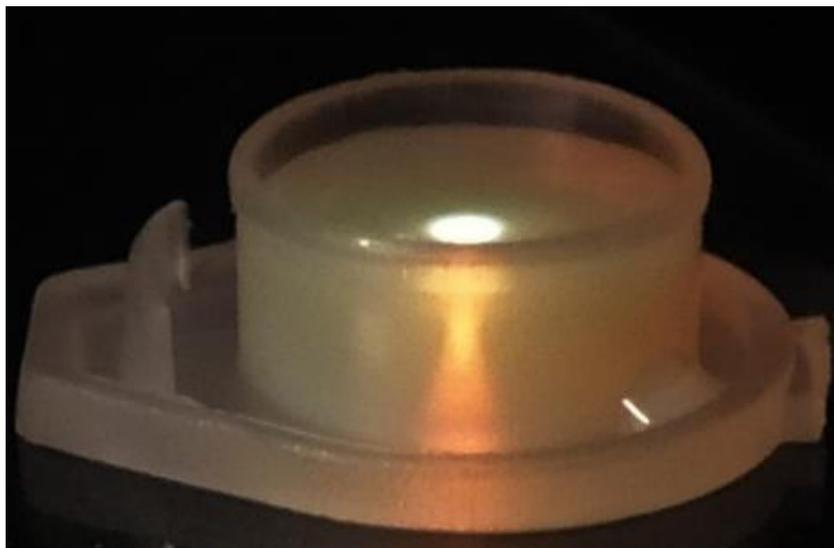
4.1 DETERMINAÇÃO DO VOLUME CONFOCAL

Para a obtenção dos espectros SERS no regime de uma única molécula utilizando a microscopia Raman confocal foi necessário investigar o volume confocal provado pelo espectrômetro Raman; esse valor permitiu determinar o volume de solução efetivamente provado pelo equipamento durante os experimentos SERS. De posse desse valor, foi possível determinar a concentração de amostra para a ocorrência do regime de uma SM.

4.1.1 *Determinação do perfil confocal*

O volume confocal é uma limitação espacial da região provada em um experimento Raman, que é referente à forma do feixe de luz (formato de cone) gerada pela lente objetiva do microscópico Raman na configuração confocal. A Figura 11 ilustra o perfil acinturado do feixe de luz (luz de referência para ajuste de foco) em uma suspensão aquosa de AgNP. Em princípio, todas as moléculas presentes dentro desse volume iluminado poderiam contribuir para o sinal SERS. Entretanto, a coleta desses fótons espalhados varia com a profundidade confocal (diferença de altura em relação ao plano focal) nas direções +Z e -Z, como ilustrado na Figura 8. No plano focal em $Z=0$ a intensidade do sinal coletada é máxima e a variação de intensidade com a altura é grande, o que faz com que apenas a luz espalhada em um determinado intervalo de alturas em relação ao plano focal seja efetivamente medida pelo espectrômetro, definindo a altura confocal (H_{confocal}) do equipamento.

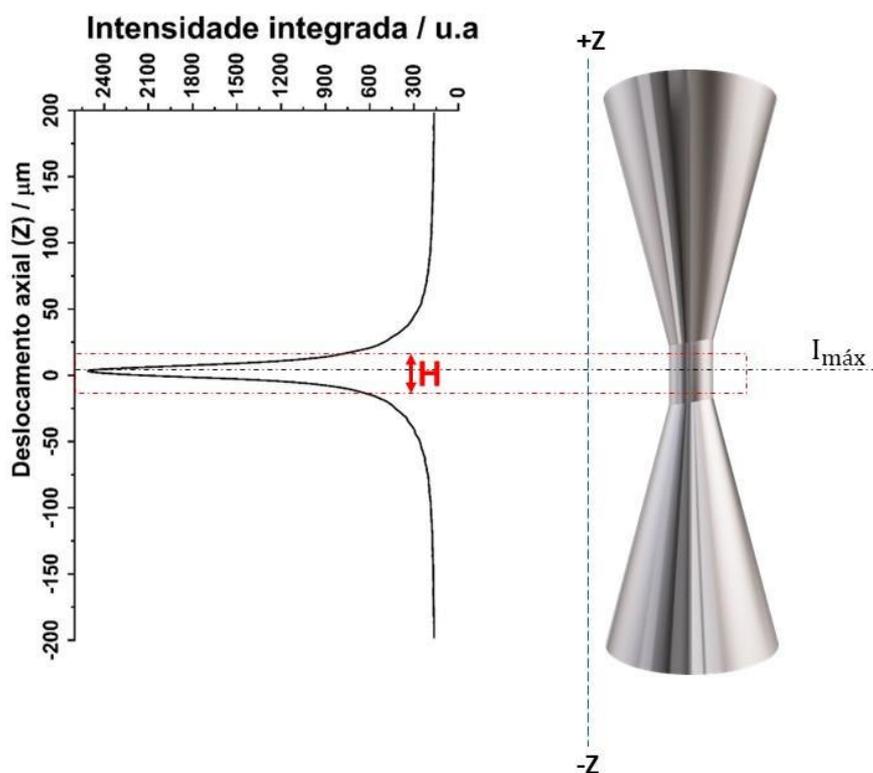
Figura 11- Forma de luz formada pela lente objetiva do microscópio Raman.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para completar a medida de volume, foi medida a área efetiva iluminada pelo *laser* e detectada pelo equipamento (A_{confocal}). O volume confocal foi obtido pela medida das duas grandezas: A_{confocal} e H_{confocal} , assumindo que o volume iluminado é um cilindro (veja Figura 12). Para a determinação dos dois valores, utilizou-se uma amostra padrão de silício (veja Figura 8). Para determinar altura do cone de luz foi mantido invariável a posição no plano XY e registrou-se a intensidade integrada da banda mais intensa do silício em $521,5 \text{ cm}^{-1}$ movimentando o estágio motorizado em $+200 \mu\text{m}$ para cima e $-200 \mu\text{m}$ para baixo em relação a plano focal em $Z=0$ a cada $2 \mu\text{m}$. A Figura 12 apresenta a variação da intensidade integrada da banda do silício em relação ao deslocamento no eixo axial utilizando a radiação incidente $632,8 \text{ nm}$ com potência de 20 mW e abertura da fenda do espectrômetro em $50 \times 1000 \mu\text{m}$. Nota-se que em $Z=0$ a intensidade integrada foi máxima. Ainda mais, observou-se que em ambos os lados há uma diminuição brusca da intensidade Raman à medida que o estágio motorizado se afasta positivamente ou negativamente do plano focal. A intensidade Raman da banda característica da amostra padrão de silício acima de $|Z| > 100 \mu\text{m}$ foi insignificante.

Figura 12- Perfil da profundidade da intensidade Raman para a intensidade integrada da banda em $521,5 \text{ cm}^{-1}$ de uma amostra padrão de silício em função do deslocamento axial (-200 a 200 μm) do estágio motorizado.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A altura confocal foi definida por uma camada efetiva de espessura H (ver cone na Figura 8) na qual todo o sinal do *spot* do laser provém. Determinou-se a altura confocal pela Equação 17 (CAI et al., 1998; LE RU et al., 2007).

$$H_{\text{confocal}} = \frac{\int_{-200\mu\text{m}}^{+200\mu\text{m}} I(z) dz}{I_{\text{máx}}}$$

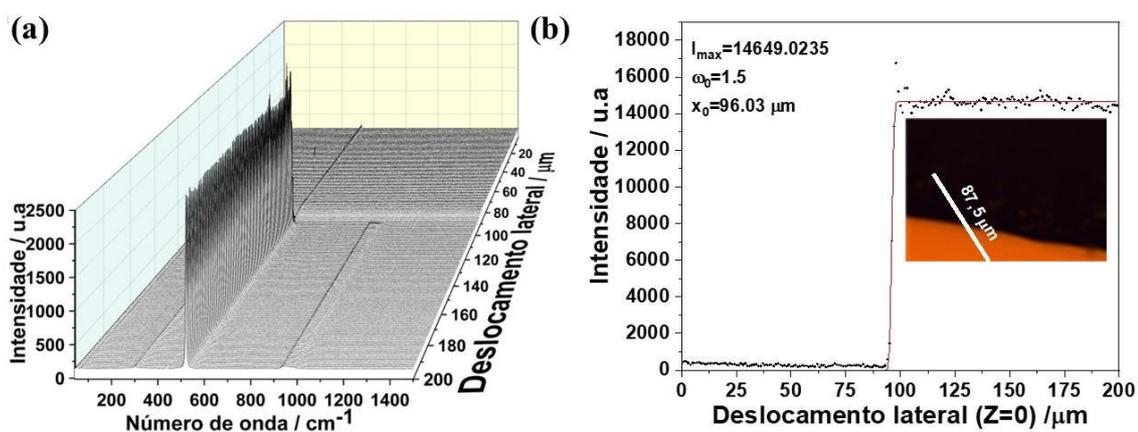
Equação 17

Onde o numerador $\int_{-200\mu\text{m}}^{+200\mu\text{m}} I(z) dz$ é obtido integrando-se a área debaixo da curva $I(z) dz$ (Figura 12) e $I_{\text{máx}}$ é a intensidade da banda quando $z=0$. As medidas foram realizadas em triplicata para minimizar o erro. Dessa forma, foi obtido o valor da $H_{\text{confocal}} = (23,8 \pm$

0,3) μm . O valor de H_{confocal} é $\pm Z$, portando, o sinal total efetivo provém do deslocamento axial de 11,9 μm acima e abaixo em relação ao plano focal.

A_{confocal} foi determinada deslocando o estágio motorizado lateralmente, ao longo do eixo X, mantendo a altura fixa em $Z=0$, através de um mapeamento linear que engloba a interface da amostra padrão de silício no plano focal (em laranja na Figura 13(b)) com uma região sem amostra (em preto na Figura 13(b)). O mapeamento linear cobriu uma distância de 87,5 μm , sendo registrado um espectro a cada 0,437 μm . A Figura 13(a) mostra o conjunto de espectros obtidos do mapeamento Raman em função do deslocamento lateral. Observa-se que a intensidade do laser foi zero quando incide fora da amostra padrão de silício e foi máxima no plano focal dentro da região que contém amostra padrão de silício. Já a Figura 13(b) mostra a dependência da intensidade com o deslocamento lateral do estágio motorizado. Nota-se que na região da interface da amostra de silício com a região sem amostra de silício houve um aumento da intensidade Raman (aproximadamente em $Z=100 \mu\text{m}$), que é explicado pela difração do laser na interface do Si com o ar. Na interface a amostra não está totalmente perpendicular à incidência do laser. Por outro lado, na região fora dessa interface o valor da intensidade foi praticamente constante, já que não sofreu o efeito de difração.

Figura 13- (a) Mapeamento Raman obtido pelo deslocamento lateral dos espectros Raman da amostra padrão de Si e (b) Perfil da Intensidade da banda Raman em $521,5 \text{ cm}^{-1}$ da amostra padrão de silício em função do deslocamento lateral.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A dependência da intensidade Raman em função do deslocamento lateral, ao longo do eixo X, pode ser descrita pela Equação 18 (LE RU et al., 2007).

$$I(X) = \frac{I_{\text{máx}}}{2} \times \left(1 - \operatorname{erf} \left(\frac{\sqrt{2} \times (X_0 - X)}{\omega_0} \right) \right)$$

Equação 18

Onde $I(X)$ é a intensidade do sinal na coordenada X , $I_{\text{máx}}$ é a intensidade máxima do sinal, erf é a função erro, X_0 é a posição onde 50% da área do spot do laser incide sob a amostra e ω_0 é a largura do spot efetivo.

A Equação 18 foi ajustada aos dados experimentais, como mostrada na Figura 13(b). Os parâmetros fornecidos pelo ajuste encontram-se na própria Figura 13. Através do valor de ω_0 foi possível calcular a área iluminada pelo laser, através da Equação 19 (LE RU et al., 2007), referente ao cálculo da área de uma base circular. Para minimizar o erro, as medidas foram obtidas em triplicata. Dessa forma, o valor obtido foi de $\omega_0 = 1,6 \pm 0,1$.

$$A_{\text{confocal}} = \frac{\omega_0^2 \times \pi}{2}$$

Equação 19

Assim, o valor da A_{confocal} medida foi $4,02 \mu\text{m}^2$. Com os valores determinados para a H_{confocal} e A_{confocal} , pode-se determinar o V_{confocal} , através da Equação 20.

$$V_{\text{confocal}} = H_{\text{confocal}} \times A_{\text{confocal}}$$

Equação 20

Dessa forma, o V_{confocal} foi de $9,57 \times 10^{-14} L$.

A concentração para a detecção de uma única molécula foi determinada como expressada abaixo:

$$1 \text{ molécula} \text{ ----- } 9,57 \times 10^{-14} L$$

$$9,57 \times 10^{14} \text{ moléculas} \text{ ----- } X \text{ ----- } 1L$$

$$6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas} \text{ ----- } 1 \text{ mol} \text{ ----- } Y$$

$$\frac{9,57 \times 10^{14} \text{ moléculas} \cdot 1 \text{ mols}}{6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas} \cdot 1L} = 1,59 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$$

O volume confocal é dependente das configurações do espectrômetro. Dessa forma, foi determinado o volume confocal para diferentes configurações de abertura confocal e da radiação incidente. Os resultados foram obtidos em triplicata na determinação da altura confocal e da área confocal para cada configuração. Com a obtenção desses dados, calculou-se o volume confocal e posteriormente a concentração característica para detecção de uma única molécula. Os valores determinados para a H_{confocal} e A_{confocal} , como as concentrações no regime de uma única molécula utilizando outras configurações do espectrômetro encontram-se nas Tabela 2 e 3. Com os valores de concentração determinados, foram obtidos os espectros SM-SERS que serão apresentados nas próximas seções.

Tabela 2- Valores das H_{confocal} , A_{confocal} e as concentrações no regime de uma única molécula determinada através do volume confocal para linha laser em 632,8 nm utilizando as aberturas focais $50 \times 1000 \mu\text{m}$ e $25 \times 1000 \mu\text{m}$.

Linha laser:		632,8 nm	
Abertura confocal (μm)	$A_{\text{confocal}} (\mu\text{m}^2)$	$H_{\text{confocal}} (\mu\text{m})$	Concentrações no regime de única molécula (mol L^{-1})
50×1000	4,02	23,80	$1,59 \times 10^{-9}$
25×1000	1,45	18,08	$4,35 \times 10^{-10}$

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 3- Valores das H_{confocal} , A_{confocal} e as concentrações no regime de uma única molécula determinada através do volume confocal para linha laser em 785 nm utilizando as aberturas confocais $50 \times 1000 \mu\text{m}$ e $25 \times 1000 \mu\text{m}$.

Linha laser:		785 nm	
Abertura confocal (μm)	$A_{\text{confocal}} (\mu\text{m}^2)$	$H_{\text{confocal}} (\mu\text{m})$	Concentrações no regime de única molécula (mol L^{-1})
50×1000	5,26	31,25	$2,72 \times 10^{-11}$
25×1000	4,50	31,64	$2,36 \times 10^{-11}$

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.1.2 Conclusões parciais

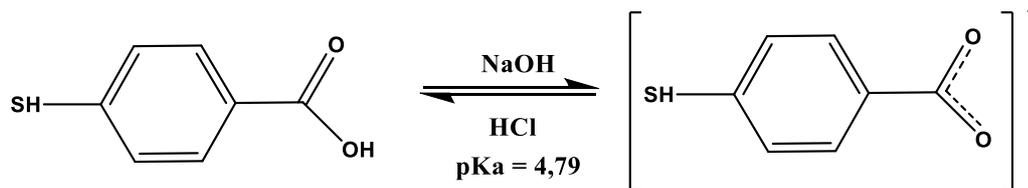
O perfil confocal do espectrômetro Raman foi determinado, possibilitando a obtenção da área, altura e volume confocal sondados pelo laser. As concentrações para a detecção de uma SM por SERS foram estimadas em diferentes configurações de espectrômetro através dos valores de volume confocal determinado.

4.2 ESTUDO ESPECTROSCÓPICO TEÓRICO PARA A MOLÉCULA 4-HMB

O estudo teórico mostrado a seguir vem para trazer informações no entendimento da formação dos agregados automontados de AgNP com ácido 4-mercaptobenzoico (4-HMB) que são discutidos na seção 4.3. O objetivo é complementar informações que não são possíveis extrair diretamente do espectro vibracional experimental.

A molécula bifuncional 4-HMB contém em suas extremidades dois grupos funcionais, o grupo carboxila e o grupo tiol (ver Figura 14). É interessante estudar essa molécula porque pode se ligar a superfície das NP por meio de um dos grupos funcionais, permitindo alterar de forma controlada o outro grupo funcional. A literatura indica que o grupo tiol (base macia de Pearson) tem preferência pela adsorção na superfície da prata (ácido macio de Pearson) levando à formação do complexo covalente S-metal (CASTRO et al., 2004; MARQUES et al., 2018). O grupo carboxila do 4-HMB possui constante de acidez, $\text{pK}_a (\text{COO-H}) = 4,79$ (PHAN; HAES, 2018; WEI et al., 2016). Portanto, em solução aquosa em pH abaixo do valor de pK_a , a espécie predominante tem o grupo carboxila protonado, como ilustrado na Figura 14.

Figura 14- Ilustração esquemática do equilíbrio químico em relação ao pH.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Seria esperado que com a adsorção do grupo tiol, o grupo carboxila de NP diferentes pudessem induzir uma conexão automontada entre as NP vizinhas através de ligações de hidrogênio intermolecular, o que conduziria a um acoplamento de dipolos alternados, resultantes do LSPR, entre as NP (LEE et al., 2011). Esse acoplamento LSPR resultaria na formação de *hot spots* no interstício entre as NP, contribuindo para o aumento da intensificação SERS (CASTRO et al., 2004). Nos agregados de NP automontados por 4-HMB, a molécula estaria contida dentro dos *hot spots*, o que pode acarretar um alto desempenho SERS. Dessa forma, é importante realizar as atribuições dos espectros Raman dos agregados automontados por 4-HMB (dímero) e do 4-HMB independente (monômero) para compreender através do perfil espectral se há a ocorrência da agregação por ligações de hidrogênio do grupo carboxila de diferentes moléculas.

4.2.1 Estabilidade de pequenos clusters de prata

Antes de prosseguir com os detalhes da simulação dos agregados automontados com 4-HMB, preliminarmente foi necessário otimizar as estruturas do *cluster* de prata. A literatura relata um grande número de estruturas atômicas/isômeros com energias similares para um tamanho específico de *cluster* de Ag neutro em diferentes níveis de teoria (CUNY et al., 2018; CUONG, 2018; OLIVEIRA et al., 2016; WANG; GONG, 2005). No presente estudo, as geometrias de equilíbrio do *cluster* AgNP na faixa de $N = 2-10$, em que N é o número de átomos foram otimizadas usando simulações baseadas na DFT com o funcional B3LYP e o conjunto de funções-base LanL2DZ. Os átomos de Ag apresentam configuração eletrônica $[\text{Kr}]4d^{10}3s^1$. Assim, a fim de reduzir o tempo computacional, os cálculos teóricos incluíram apenas o *cluster* Ag neutro com spin restrito (camada fechada), ou seja, com multiplicidade de spin dos *clusters* sendo um. Portanto, foram otimizadas as estruturas de *cluster* Ag₂, Ag₄, Ag₆, Ag₈ e Ag₁₀, mantendo o número par de átomos de Ag.

A evolução das energias de ligação (EL) por átomo em função do tamanho do *cluster* Ag foi calculada conforme a Equação 21 (OLIVEIRA et al., 2016).

$$E_L(N) = \frac{\left(\frac{N}{2}E_2 - E_N\right)}{\frac{N}{2}}$$

Equação 21

Onde E_2 e E_N são as energias totais de dois átomos de prata e do *cluster* com N átomos, respectivamente.

Os resultados da energia absoluta dos *cluster* de prata Ag₂ a Ag₁₀ e as energias de ligação por átomo de prata são exibidas na Tabela 4. Nota-se que o valor da energia absoluta diminui com a adição de átomos de Ag ao *cluster* e essa diminuição é devido ao maior número de elétrons presente no *cluster*. Também calculamos as energias de ligação por átomos no *cluster* a partir da Equação 21, que também são apresentadas na Tabela 4. Nota-se um valor crescente na energia de ligação com a adição de átomos de Ag no *cluster*. O aumento dos valores da energia de ligação está associado à forte ligação dentro do *cluster*, indicando sua estabilização.

Tabela 4- Energia absoluta dos *cluster* de prata Ag₂ a Ag₁₀ e energia de ligação. N é o número de átomos de prata.

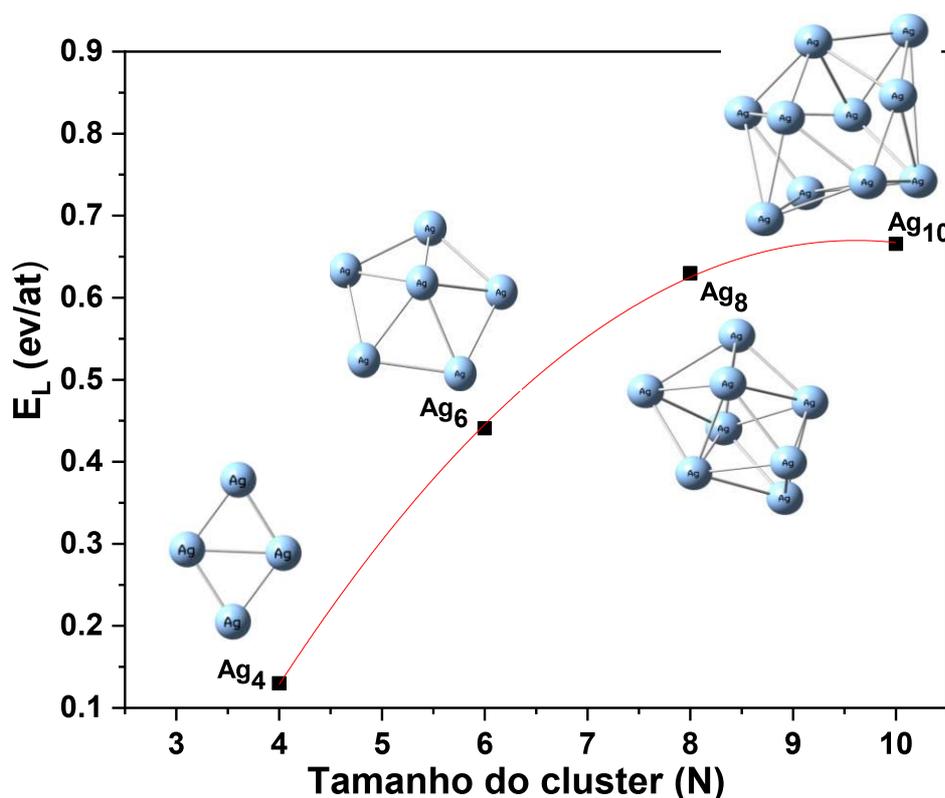
N	Energia absoluta / eV	EL/ eV
2	-7934,5	-
4	-15869,0	0,13
6	-23804,7	0,44
8	-31740,4	0,63
10	-39675,7	0,66

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As estruturas otimizadas dos *cluster* de prata para Ag₄ a Ag₁₀ e as energias de ligação por átomo em relação ao *cluster* Ag₂ são mostradas na Figura 15. Pode-se notar que a curva de energia de ligação por átomos dos *cluster* de Ag tende a aumentar com o número de átomos de Ag, indicando que cada um desses *cluster* é mais estável que seu vizinho. Além disso, os valores

de energia de ligação indicam fortemente um padrão de estabilização por crescimento dos *clusters*. O crescimento é mais acentuado para os *clusters* Ag₄, Ag₆ e Ag₈ e para *clusters* de 10 átomos nota-se uma convergência. Dessa forma, há uma indicação de que *clusters* de Ag com 10 ou mais átomos apresentam estrutura estável, mas com energia de ligação por átomo similar.

Figura 15- Estruturas otimizadas e a evolução da energia de ligação dos *clusters* de prata em função do tamanho dos *clusters*.



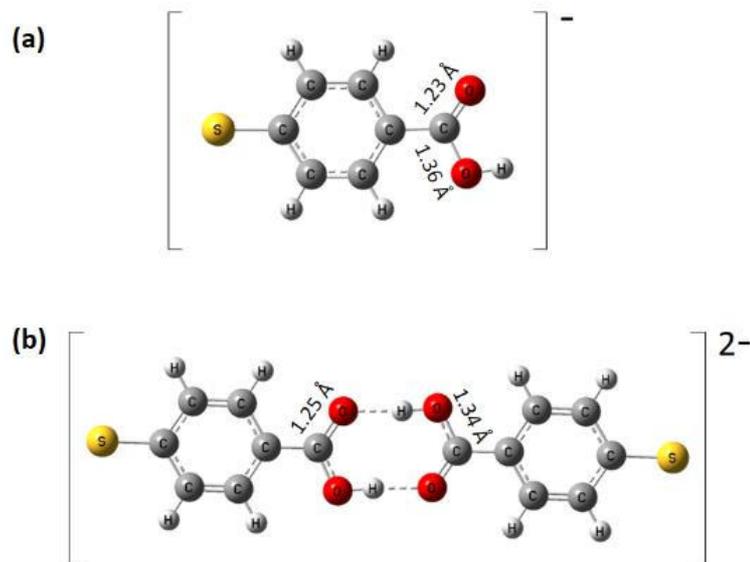
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.2.2 Espectros Raman teóricos

A Figura 16 mostra as estruturas otimizadas do 4-HMB na forma monomérica e dimérica utilizando o método B3LYP descrito na seção 3.3. Nota-se em ambas as estruturas que todos os átomos se encontram no mesmo plano. Foram analisados comprimento de ligação C-O e C=O do grupo carboxila no monômero e dímero, já que variações no comprimento dessas ligações podem alterar a posição das bandas associadas a esses grupos no espectro Raman. Foi observado no dímero uma diminuição no comprimento da ligação C-O de 0,02 Å e um aumento na ligação C=O de 0,02 Å. Esta pequena variação pode promover mudanças no perfil espectral.

Além disso, foram analisados o comprimento das ligações de hidrogênio. A distância da ligação O---H foi de 1,65 Å, conforme esperado para ligações hidrogênio (RODRIGUES, 2000).

Figura 16- Geometria otimizada da molécula 4-mercaptobenzoico na forma (a) monômero e do (b) dímero. As estruturas foram caracterizadas como mínimos locais de energia potencial no mesmo nível de teoria.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A partir das estruturas otimizadas foram obtidos os espectros Raman teóricos. Os resultados dos cálculos são dados em função da atividade Raman. Para convertemos a atividade Raman (A_i) em intensidade Raman (I_i) utilizou-se a Equação 22 (HO; LEE, 2015).

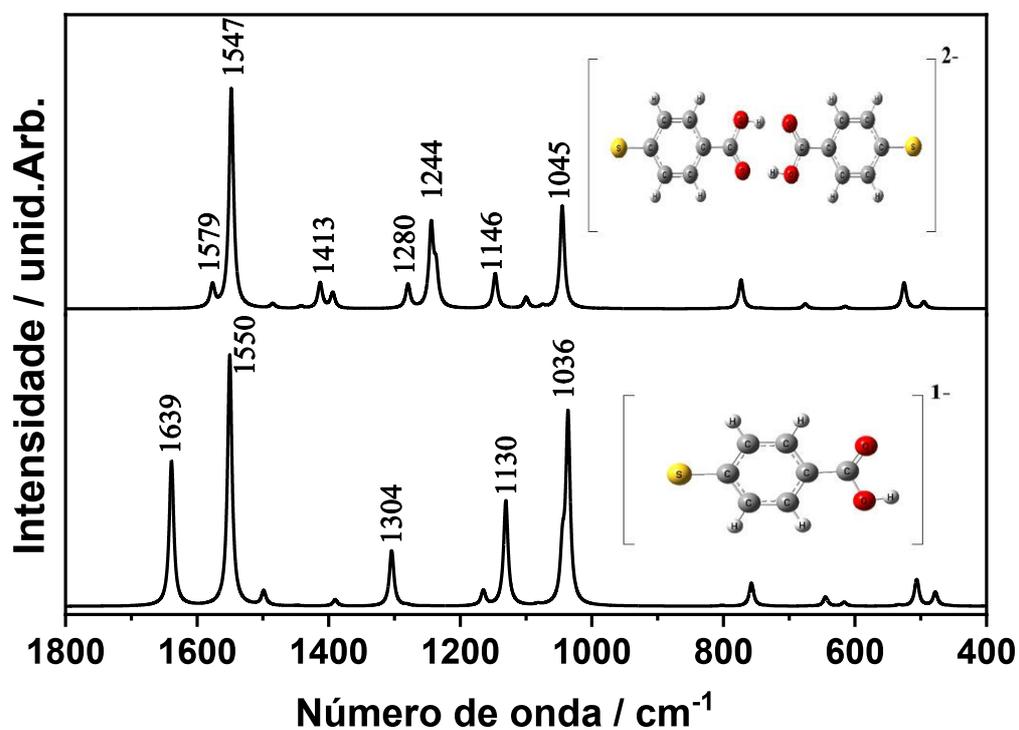
$$I_i = \frac{\alpha A_i (\nu_0 - \nu_i)^4}{\nu_i (1 - e^{-hc\nu_i/k_b T})}$$

Equação 22

Onde ν_0 é a frequência da linha do laser; ν_i é a frequência vibracional; T é a temperatura; h e k_b são constantes de Planck e Boltzmann, respectivamente; c é a velocidade da luz no vácuo e α é um fator de ajuste de todas as intensidades da banda e é equivalente a 10^{-12} . As frequências fundamentais foram escalonadas por um fator 0,9613 (WONG, 1996).

Os espectros Raman teóricos calculados para dímero e monômero do 4-HMB são mostrados na Figura 17 e as atribuições das bandas Raman são exibidas na Tabela 5. Como visto na Figura 17, o espectro Raman do monômero é caracterizado por cinco bandas intensas em 1639, 1550, 1304, 1130 e 1036 cm^{-1} . As duas bandas principais em 1550 e 1036 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais $\nu(\text{CC}) + \delta(\text{HCC})$, e $\nu(\text{SC}) + \nu(\text{CC}) + \delta(\text{CCC})$, respectivamente. A banda de intensidade média em 1639 cm^{-1} é atribuída ao $\nu(\text{OC})$. As bandas em 1304 e 1130 cm^{-1} são atribuídas a $\delta(\text{HOC}) + \nu(\text{CC}) + \nu(\text{CO}) + \delta(\text{OCO})$ e $\delta(\text{HCC}) + \delta(\text{HOC}) + \nu(\text{CC})$, respectivamente.

Figura 17- Espectros Raman teóricos do 4-mercaptobenzoico monômero e dímero.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 5- Números de onda Raman (dados em cm^{-1}) e atribuições das bandas Raman para o 4-HMB (monômero e dímero, como indicado) calculados no nível de teoria DFT, B3LYP/6-31++G(d,p).

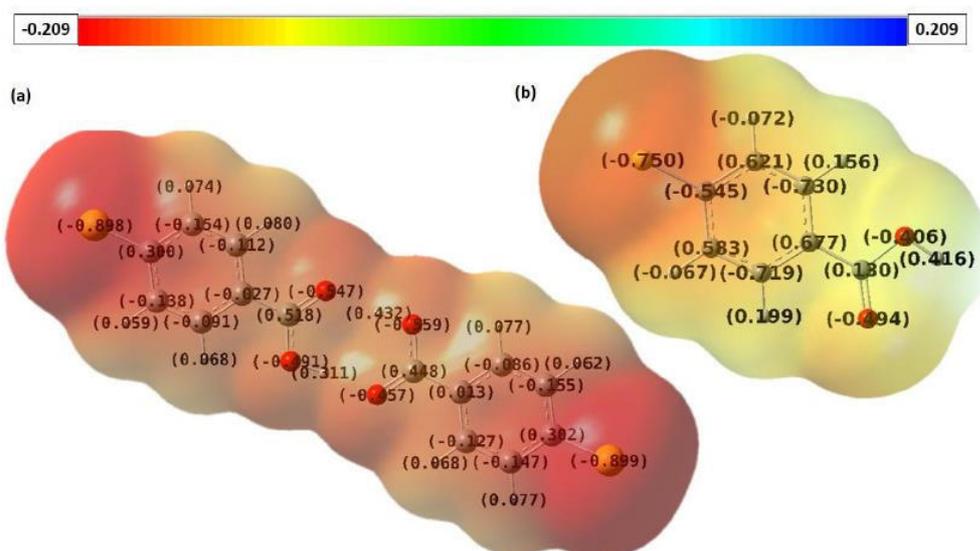
DFT/B3LYP		Atribuição ^a
Monômero	Dímero	
478	495	$\delta(\text{OCC})(43\%) + \nu(\text{SC})(12\%) + \delta(\text{CCC})(11\%)\text{m} - \delta(\text{OCC})(46\%)\text{d}$
507	-	$\delta(\text{OCO}) (29\%) + \nu(\text{SC})(23\%) + \delta(\text{OCC})(12\%) + \nu(\text{CC})(10\%)$
615	616	$\delta(\text{CCC})(68\%)\text{m} - \delta(\text{CCC})(91\%)\text{d}$
645	-	$\delta(\text{OCO})(34\%) + \delta(\text{CCC})(21\%) + \nu(\text{SC})(14\%)$
-	677	$\tau(\text{CCCC})(50\%)$
758	773	$\nu(\text{CC})(46\%) + \delta(\text{CCC})(17\%)\text{m} - \nu(\text{CC})(10\%)\text{d}$
1036	-	$\nu(\text{SC})(22\%) + \delta(\text{CCC})(18\%)+ \nu(\text{CC})(13\%)$
1045	1045	$\nu(\text{OC})(54\%) + \nu(\text{CC})(12\%) + \delta(\text{HOC})(10\%)\text{m} - \nu(\text{SC})(26\%)\text{d}$
-	1099	$\nu(\text{OC})(17\%)$
1130	1075	$\delta(\text{HCC})(37\%) + \delta(\text{HOC})(19\%) + \nu(\text{CC})(10\%)\text{m} - \delta(\text{HCC})(48\%)\text{d}$
1165	1146	$\delta(\text{HCC})(34\%) + \delta(\text{HOC})(25\%)\text{m} - \delta(\text{HCC})(23\%)\text{d}$
-	1244	$\delta(\text{HCC})(22\%)$
-	1280	$\delta(\text{HCC})(33\%) + \nu(\text{CC})(16\%)\text{m} - \delta(\text{HCC})(10\%)\text{d}$
1304	-	$\delta(\text{HOC})(27\%) + \nu(\text{CC})(18\%) + \nu(\text{OC})(15\%) + \delta(\text{OCO})(12\%)$
1390	1396	$\nu(\text{CC})(58\%)\text{m} - \nu(\text{CC})(55\%)\text{d}$
-	1413	$\nu(\text{OC})(29\%) + \delta(\text{HOC})(21\%) + \delta(\text{OHO})(10\%)$
-	1441	$\delta(\text{HCC}) (20\%)$
1499	1485	$\nu(\text{CC})(54\%) + \delta(\text{CCC})(10\%)\text{m} - \nu(\text{CC})(23\%)\text{d}$
1550	1547	$\nu(\text{CC})(55\%) + \delta(\text{HCC})(10\%)\text{m} - \nu(\text{CC})(20\%)\text{d}$
1639	1579	$\nu(\text{OC})(75\%) \text{m}$

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: ^a As atribuições foram baseadas na distribuição de energia potencial calculada pelo software Veda 4 (JAMRÓZ, 2013). ν : estiramento; δ : deformação no plano; τ : deformação fora do plano; m=monômero e d=dímero.

No espectro calculado para o dímero, observa-se a presença de três bandas em 1413, 1280 e 1244 cm^{-1} , que estão ausentes no espectro do monômero. Essas bandas são atribuídas aos modos vibracionais $\nu(\text{CO}) + \delta(\text{HOC})$, $\delta(\text{HCC})$ e $\delta(\text{HCC})$, respectivamente. Ainda mais, a banda em 1639 cm^{-1} no monômero, atribuída a $\nu(\text{OC})$, desloca-se para 1579 cm^{-1} e a intensidade relativa diminui drasticamente, indicando que o modo de vibração $\nu(\text{CO})$ é extremamente sensível às interações de ligações de hidrogênio e pode ser um indicativo da formação do dímero no meio. Ao analisar o gráfico de superfície de potencial eletrostático molecular do monômero e dímero junto com as cargas pontuais em seus átomos, ambas ilustradas na Figura 18, nota-se que a carga atômica do átomo de carbono da ligação C=O aumento em relação ao monômero, enquanto há maior densidade de carga negativa no átomo de oxigênio. Além disso, observa-se que no dímero houve uma diminuição na carga negativa no anel de benzeno, indicando mais elétrons. O aumento da intensidade da banda em 1547 cm^{-1} atribuído ao νCC do anel reforça essa indicação obtida da superfície de potencial eletrostático.

Figura 18- Superfície de potencial eletrostático molecular e cargas atômicas pontuais do íon 4-mercaptbenzóico (a) dímero e (b) monômero.



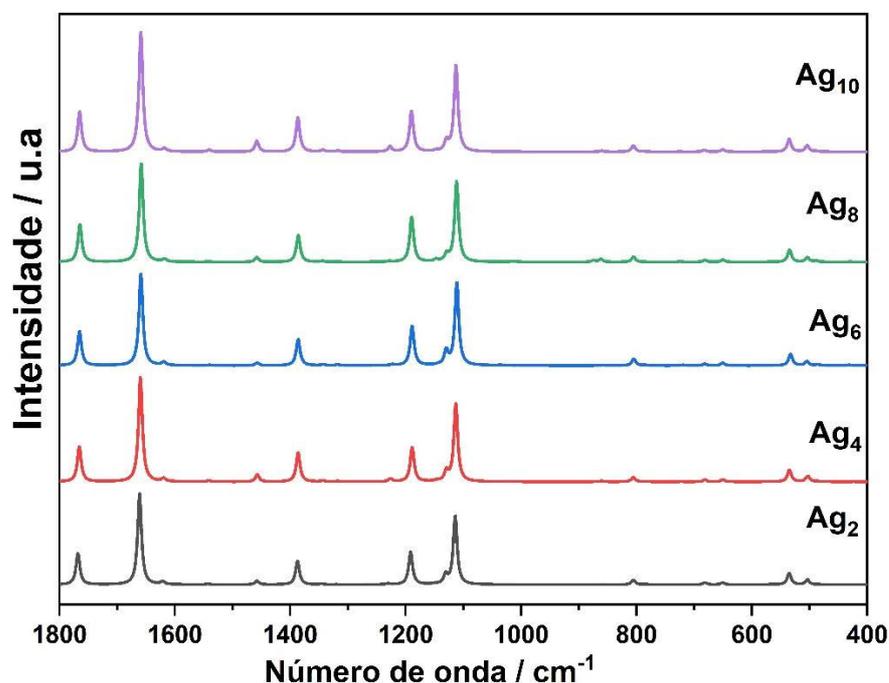
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.2.3 Espectros SERS do ácido 4-mercapbenzoico adsorvido no cluster Ag_4

Como o objetivo desse estudo foi investigar experimentalmente a formação dos agregados automontados por 4-HMB induzido por ligação de hidrogênio dos grupos carboxilas para a obtenção do espectro SM-SERS, foram obtidos os espectros SERS teórico dos complexos modelo $Ag_4(4\text{-HMB})$ e $Ag_4(4\text{-HMB})_2\text{-}Ag_4$ para comparação. Para o cálculo do espectro SERS teórico foi utilizado o funcional CAM-B3LYP proposto por Yanai, Tew e Handy (2004) e as frequências vibracionais foram escalonadas por um fator 0,953 (KASHINSKI et al., 2017; RODRIGUES-OLIVEIRA et al., 2018).

Primeiramente, sondamos a adsorção do monômero de 4-HMB nos diferentes *clusters* (Ag_2 , Ag_4 , Ag_6 , Ag_8 , Ag_{10}), tendo em vista que o *cluster* Ag_{10} foi o mais estável. Em virtude da quimissorção do 4-HMB em Ag pelo grupo tiol, pode ocorrer um processo de transferência de carga da Ag para a molécula ou vice-versa. A princípio a ideia foi verificar se o tamanho dos agregados acarretaria mudanças significativas nas intensidades ou nas posições das bandas Raman calculadas. A comparação entre os espectros SERS teóricos do monômero de 4-HMB adsorvido em tamanhos diferentes de agregados é mostrada na Figura 19. Nota-se que há constância na posição das bandas, bem como nas intensidades relativas entre os espectros Raman teóricos do 4-HMB adsorvido nos diferentes *clusters*. Dessa forma, a maior estabilidade *cluster* não acarreta mudanças espectrais significativas. A fim de reduzir o tempo computacional, os *clusters* Ag_4 foram selecionados como modelo de superfície para o estudo dos agregados automontados com um dímero de 4-HMB através das ligações de hidrogênio intermoleculares do grupo carboxila.

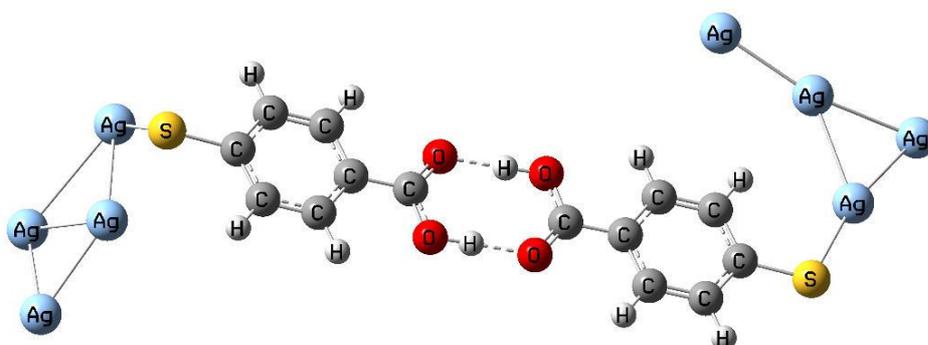
Figura 19- Comparação entre os espectros SERS teórico do monômero de 4-HMB adsorvido em diferentes tamanhos *cluster* de Ag.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A estrutura otimizada dos agregados de Ag_4 automontados com um dímero de 4-HMB, que gerou o complexo modelo $[Ag_4-(4-HMB)_2-Ag_4]$ é mostrada na Figura 20. O modelo otimizado mostra que o sítio de ligação preferencial é o átomo de S no agregado de Ag_4 e a ligação de hidrogênio entre os grupos carboxilas de duas moléculas diferentes de 4-HMB.

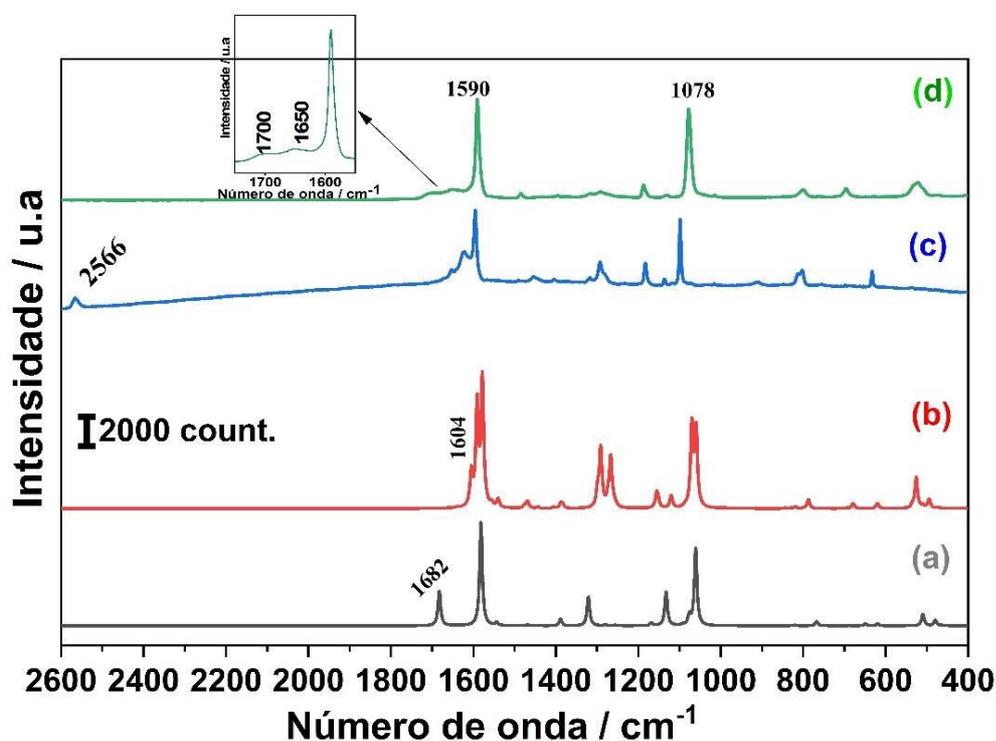
Figura 20- Geometria otimizada para o agregado de Ag_4 automontado por 4-HMB.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A partir da otimização da geometria do modelo para o agregado automontado $[Ag_4-(4-HMB)_2-Ag_4]$ foi obtido o espectro SERS teórico. A Figura 21(b) mostra o espectro SERS simulado por DFT do agregado automontado $[Ag_4-(4-HMB)_2-Ag_4]$ em comparação com o espectro SERS simulado do 4-HMB independente (monômero) adsorvido no *cluster* de Ag_4 ($Ag_4-(4-HMB)$), na Figura 21(a). Os espectros Raman experimentais de 4-HMB sólido e SERS médio de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ 4-HMB em pH=4 também são apresentados nas Figura 21(c) e (d), respectivamente. Conforme mostrado na Figura 21, os espectros Raman e SERS assemelham-se aos encontrados em trabalhos anteriores tanto em relação às posições de bandas Raman como às intensidades relativas, conforme exibido na Tabela 6. Nota-se na Figura 21 uma boa concordância entre o espectro SERS teórico, o espectro Raman do sólido e o SERS experimental do 4-HMB, exceto por algumas pequenas discrepâncias.

Figura 21- Comparação entre (a) espectro SERS teórico da estrutura independente $Ag_4-(4-HMB)$ e (b) espectro SERS teórico do agregado automontado ($[Ag_4-(4-HMB)_2-Ag_4]$); (c) Espectro Raman do 4-HMB sólido e (d) espectro SERS médio experimental de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ 4-HMB em pH=4. A inserção mostra um zoom na faixa de 1750-1550 cm⁻¹ do espectro em (d). As frequências calculadas são representadas com um FWHM= 4 cm⁻¹.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 6- Bandas Raman (em cm^{-1}) e atribuição vibracional para os espectros Raman e SERS do sólido 4-HMB e 4-HMB-AgNPs ($5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1}) em $\text{pH}=4$. Os espectros SERS simulados e as atribuições para o complexo $[\text{Ag}_4-(4\text{-HMB})_2\text{-Ag}_4]$ calculados no nível CAM-B3LYP/6-31++G(d,p) também são apresentados.

Experimental		calculado	Atribuições ^a
Sólido	SERS		
-	522	526	$\nu(\text{SC})(25\%)+\delta(\text{OCC})(15\%)$
632	-	619	$\delta(\text{CCC})(76\%)$
-	696	678	$\tau(\text{CCCC})(33\%)+\delta(\text{OCO})(26\%)$
803	801	787	$\tau(\text{CCC})$ $(\text{CC})(10\%)$
-	-	1059	$\nu(\text{CC})(25\%)+\nu(\text{SC})(22\%)+\delta(\text{CCC})(17\%)$
1098	1078	1070	$\nu(\text{CC})(31\%)+\delta(\text{CCC})(22\%)+\nu(\text{SC})(22\%)$
1136	-	1120	$\delta(\text{HCC})(37\%)+\nu(\text{CC})(10\%)$
1183	-	1155	$\delta(\text{HCC})(53\%)+\nu(\text{CC})(12\%)+\nu(\text{OC})(10\%)$
1292	1187	1267	$\delta(\text{HCC})(34\%)+\nu(\text{OC})(12\%)+\delta(\text{HCO})(11\%)$
1317	-	1291	$\nu(\text{OC})(12\%) \delta(\text{HCO})(12\%) \delta(\text{HCC})(14\%)$
-	-	1299	$\nu(\text{OC})(21\%) + \delta(\text{HCC})(13\%) + \nu(\text{CC})(12\%) + \delta(\text{HOC})(11\%)$
-	-	1387	$\nu(\text{CC})(50\%)$
-	1484	1468	$\delta(\text{HCC})(38\%)+\nu(\text{CC})(10\%)$
-	-	1540	$\nu(\text{CC})(20\%)$
1595	1590	1578	$\nu(\text{CC})(55\%)$
-	-	1590	$\nu(\text{CC})(55\%)$
1622	1620	1604	$\nu(\text{OC})(48\%)+\delta(\text{HOC})(12\%)$
1652	1650	-	$\nu(\text{OC})$
2566	-	-	$\nu(\text{SH})$

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Nota: ν : estiramento; δ : deformação no plano; τ : deformação fora do plano.

^a As atribuições foram baseadas na distribuição de energia potencial calculada pelo software Veda4, conforme a referência (JAMRÓZ, 2013).

O espectro Raman do 4-HMB sólido apresentou uma banda em 2580 cm^{-1} , atribuída ao $\nu(\text{SH})$ (MICHOTA; BUKOWSKA, 2003), que não é observada nos espectros SERS experimental e simulado. A ausência dessa banda implica que há adsorção pelo grupo tiol, gerado pela cisão da ligação SH para adsorção na superfície da prata. Nota-se que o espectro SERS experimental foi dominado por duas bandas fortes em 1590 e 1078 cm^{-1} , que são atribuídas a diferentes modos $\nu(\text{CC})$ do anel aromático (ZHU et al., 2014). Essas duas bandas foram previstas no SERS teórico tanto dos agregados automontados quanto das estruturas independentes. Assim, as bandas acima não podem ser usadas como bandas marcadora para prever a formação dos agregados automontados por 4-HMB. No entanto, pode-se observar na Figura 21(a) do espectro simulado da estrutura independente uma banda em 1682 cm^{-1} atribuída ao $\nu(\text{C=O})$. Essa banda indica que o grupo carboxila está livre, ou seja, não induziu ligações de hidrogênio. Essa banda não foi observada na Figura 21(b) do espectro simulado dos agregados automontados. Por outro lado, a vibração $\nu(\text{C=O})$ em 1682 cm^{-1} (Figura 21(a)) muda para 1604 cm^{-1} no espectro SERS dos agregados automontados e a intensidade diminui (Figura 21(b)). A presença dessa banda sugere que a indução pelo grupo COOH da formação dos agregados por meio das ligações de hidrogênios poderia ser monitorada por ela, mostrando a sua sensibilidade com à formação das ligações hidrogênio.

Na inserção da Figura 21(d), referente ao espectro SERS médio experimental de 4-HMB em $\text{pH}=4$, nota-se uma banda fraca em 1700 cm^{-1} atribuída a $\nu(\text{C=O})$ do ácido carboxílico protonado na estrutura independente. Ainda mais, também foi observada uma banda fraca em 1650 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao modo $\nu(\text{C=O})$ de um ácido carboxílico envolvido em ligação de hidrogênio com outro grupo COOH. Seria razoável afirmar que a análise do espectro SERS médio do 4-HMB em comparação com os modelos teóricos indicou a presença de ambas as estruturas do 4-HMB adsorvidas em AgNP na forma independente e na forma de agregados (*hot spot*) induzidos por ligações de hidrogênio. A presença da banda em 1700 cm^{-1} em espectros SERS experimentais pode ser um indicativo da formação dos agregados automontados. Acredita-se que neste regime de concentração ($5,0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$), as moléculas de 4-HMB monomérico só seriam evidenciados por estarem localizados na região dos *hot spots* formados pelas estruturas agregadas com dímero de 4-HMB.

Na simulação do espectro SERS da estrutura agregada mostrada na Figura 21(b), pode-se observar uma separação em algumas bandas Raman, como a observada em 1059 e 1070 cm^{-1} . As separações de bandas não são notadas no espectro da estrutura independente visualizada na Figura 21(a). A separação de bandas poderia estar associada à formação de ligações de hidrogênio em dímeros de 4-HMB. No entanto, nos espectros experimentais mostrados na Figura 21(d), a separação de bandas não foi observada. Isso pode ser entendido considerando que pode haver uma sobreposição de bandas divididas nos espectros experimentais devido a uma largura total à meia altura (FWHM) maior do que na simulação. Os espectros Raman simulados foram plotados com a FWHM de 4 cm^{-1} , enquanto nos espectros experimentais a FWHM é próxima a 10 cm^{-1} . Portanto, apesar das simulações indicarem a possibilidade de diferenciar as duas estruturas por essas bandas, na análise das medidas experimentais não foi possível utilizá-las para diferenciar as estruturas. Dessa forma, a observação da banda atribuída à vibração $\nu(\text{C}=\text{O})$ é o único indicativo de formação da estrutura dimérica de 4-HMB para formação dos agregados de AgNP.

4.2.4 Conclusões parciais

Na presente seção os cálculos de DFT no nível B3LYP de teoria foram realizadas para prever as estruturas dos agregados de Ag_N para agrupamentos $N=2-10$ átomos. Mostramos que os agregados de 10 átomos são mais estáveis. Além disso, verificamos pela evolução da energia de ligação uma tendência a convergir para agregados maiores que $N=10$. Os parâmetros estruturais do 4-HMB na forma monomérica e dimérica foram obtidos. A análise do cálculo teórico baseado em DFT, permitiu uma análise das bandas Raman e SERS para analisar evidências de formação de uma estrutura que envolvia ligações de hidrogênio interpartículas. No espectro Raman calculado para o dímero foram notadas a presença de três bandas em 1413, 1280 e 1244 cm^{-1} que estavam ausentes no espectro do monômero. A comparação das simulações entre os espectros SERS agregados e independente do 4-HMB, demonstraram que é possível distinguir a presença dos agregados automontados pelo modo vibracional $\nu(\text{C}=\text{O})$. Ainda mais, verificou-se no espectro experimental que a adsorção ocorre pelo grupo tiol na superfície da Ag e que há indícios de que 4-HMB forma uma estrutura agregada com 4-HMB induzido por ligações de hidrogênio entre o grupo $-\text{COOH}$.

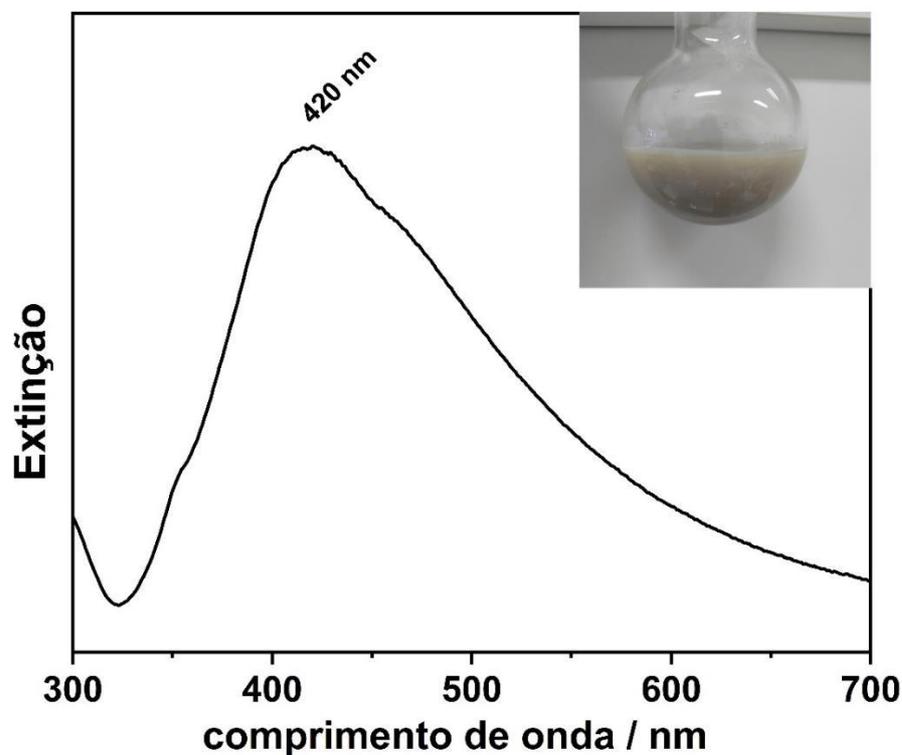
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE PRATA

A preparação das NP esféricas Ag foi realizada pelos dois protocolos descritos na seção 3.2.1 e 3.2.2. O processo de obtenção das AgNP é dado por redução Ag^+ com citrato de sódio ou boroidreto de sódio em excesso. Esses processos consistem numa nucleação rápida seguida por rápido crescimento.

4.3.1 Caracterização das AgNP

Como pode ser visto no espectro de extinção da Figura 22 o coloide de AgNP preparado por redução citrato de sódio apresenta uma banda LSPR larga na região do visível, com o máximo em 420 nm, que resulta da formação de NP esféricas com distribuição de tamanhos bastante larga, que está de acordo com o esperado segunda a literatura (LEE; MEISEL, 1982).

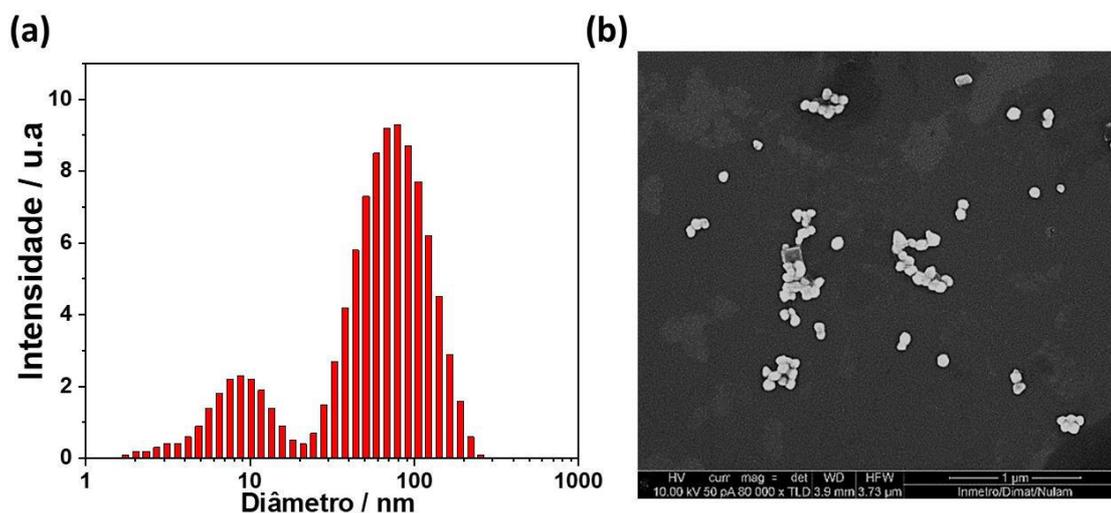
Figura 22- Espectro de extinção para as AgNP utilizando o redutor citrato de sódio.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS - dynamic light scattering) é útil para se realizar medidas visando observar a distribuição de tamanho de NP em suspensão. O diâmetro médio obtido por essa técnica corresponde ao maior diâmetro da partícula mais a espessura da dupla camada elétrica (ROZENFELD, 2011). A Figura 23(a) exibe as distribuições de tamanho das AgNP obtidas por DLS. Pode-se observar a predominância de AgNP de tamanho médio de 91 nm e a presença de uma distribuição de AgNP menores, em 9 nm. As medidas de MEV forneceram informações importantes sobre a forma e o tamanho das AgNP sintetizadas. A Figura 23(b) mostra uma micrografia de MEV das AgNP sintetizadas. A micrografia apresentou morfologias esferoides razoavelmente bem definidas, que resultaram em um diâmetro médio de 83 nm. Além disso, foi observado que boa parte das AgNP se encontram aglomeradas, o que pode ter sido ocasionado pelo efeito de secagem. O dado obtido pela medida DLS é condizente com a medida de micrografia MEV. Ainda mais, os resultados condizem com o máximo de extinção do LSPR (420nm) e com larga distribuição de tamanhos da banda LSPR.

Figura 23- Distribuição de tamanho das AgNP medida por (a) DLS e; (b) micrografia eletrônica de varredura das AgNP.

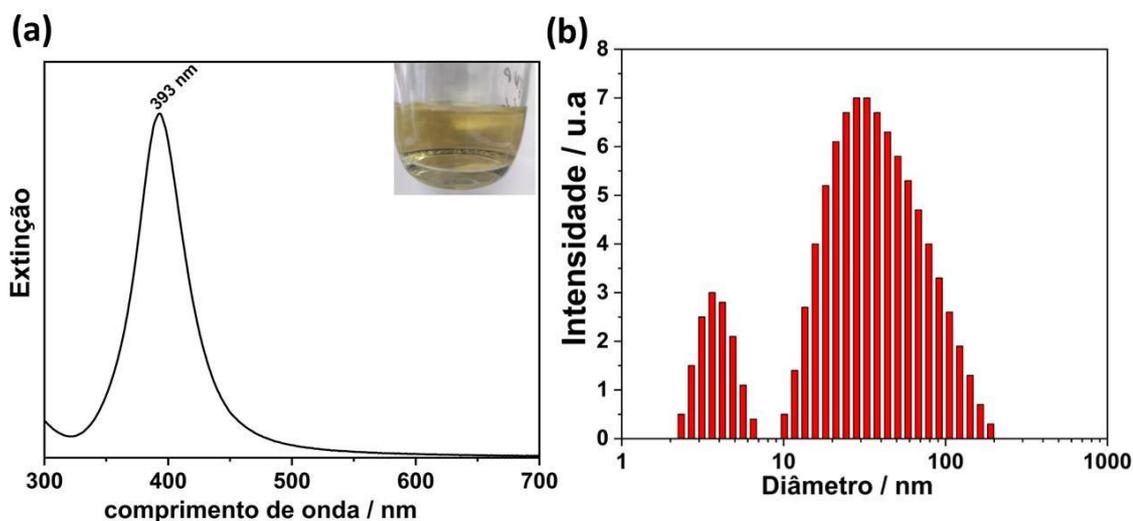


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A Figura 24(a) mostra o espectro de extinção do coloide de Ag obtido pela redução da Ag^+ com o boridreto de sódio. Nesse espectro foi visualizada uma banda LSPR estreita na região do visível, com o máximo de extinção em 393 nm. O perfil espectral apresentado é característico da formação de AgNP com distribuição de tamanho mais homogênea do que a

observada para as AgNP obtidas utilizando citrato como redutor. A Figura 24(b) mostra a distribuição de tamanho das AgNP obtidas por medidas DLS. Observa-se que a suspensão coloidal apresenta tamanho médio de 29 nm, como esperado de acordo com a literatura (CREIGHTON; BLATCHFORD; ALBRECHT, 1979).

Figura 24- (a) Espectro de extinção para as AgNP utilizando o redutor boroidreto de sódio e (b) DLS da suspensão de coloidal.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.3.2 Conclusões parciais

Mostramos a viabilidade de sintetizar AgNP no formato esférico estabilizadas por citrato sódio e boroidreto de sódio. A formação das AgNP foi mostrada pela ressonância de plásmon de superfície localizado no espectro UV-VIS. A análise de microscopia eletrônica de varredura para a síntese com íons citratos permitiu verificar a morfologia das AgNP e as análises de DLS para ambas as sínteses trouxeram informações do diâmetro médio das AgNP.

4.4 SERS DE UMA ÚNICA MOLÉCULA

Para a obtenção dos espectros SM-SERS, optou-se por trabalhar com substrato de AgNP por permitir maiores intensificações SERS em relação as AuNP, na configuração do espectrômetro com $\lambda_0 = 632,8$ nm e abertura confocal 50×1000 μm . Como determinada na seção

4.1, a concentração de analito para atingir o regime de uma única molécula nessa configuração foi de $1,59 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. As suspensões coloidais de Ag foram utilizadas por até 3 meses após o seu preparo na obtenção dos espectros SERS.

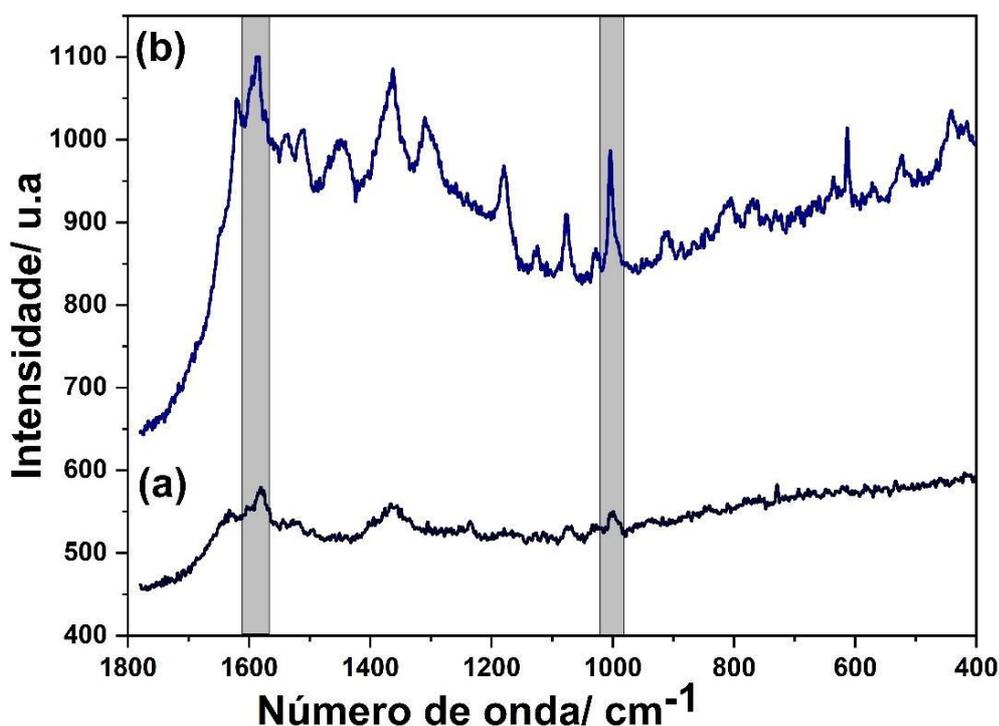
4.4.1 *Caracterização do problema na obtenção do espectro SM-SERS*

A princípio optamos por trabalhar com as nanopartículas sintetizadas pelo procedimento da seção 3.2.1, utilizando citrato como redutor para a obtenção dos espectros SM-SERS. Essas AgNP apresentaram uma banda de extinção larga, que apresentava valores de extinção razoáveis em comprimento de onda próximos da ressonância com a radiação incidente em 632,8 nm, como pode ser visto na Figura 22, o que contribuiria para o aumento da intensificação SERS. Como já mencionado na seção 4.4.1, os íons citrato estabilizam as AgNP por adsorverem nas superfícies das nanopartículas, gerando repulsões eletrostáticas entre estas. Entretanto, a presença desses íons pode inviabilizar as análises no regime de SM se apresentarem sinal na mesma região do adsorbato. Para verificar se os íons citrato ou a presença de impurezas no coloide de Ag poderiam interferir nas análises, obteve-se o espectro SERS do coloide de Ag nas mesmas condições do adsorbato descrita na seção 3.6.1, substituindo a adição do adsorbato por água. A Figura 25(a) exhibe o espectro SERS da suspensão de Ag obtidos dessa forma. Observa-se um espectro Raman bastante ruidoso e a presença de bandas de baixa intensidade. A diferença de polarizabilidade da interação da radiação incidente com a Ag é desprezível, já que a Ag é muito polarizável. Assim, não era esperado qualquer sinal SERS das AgNP, diferente do que se observa Figura 25(a). Dessa forma, questionamos sobre a possibilidade de o sinal obtido ser em decorrência de contaminação no preparo do substrato SERS. Assim, foi realizado o descarte da suspensão e o preparo de novas suspensões coloidais e novamente os sinais SERS foram notados. A observação de bandas no espectro SERS pode ser decorrente dos íons citrato. Podemos atribuir a banda em 1367 cm⁻¹ ao modo vibracional de estiramento simétrico da carboxila $\nu_s(\text{COO})$, e a banda em 1580 cm⁻¹ ao estiramento antissimétrico da carboxila $\nu_a(\text{COO})$, ambos do citrato. Já a banda em 1072 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento $\nu(\text{C-OH})$ (PANDOLI et al., 2020). Dessa forma, pode-se inferir que o sinal obtido para as AgNP é dos íons citrato.

Para sanar a interferência no espectro, já que as bandas de maior intensidade do 4-HMB coincidem com as bandas do íon citrato, foi proposta uma maneira simples para a remoção do excesso de íons citrato, que é através da centrifugação. Nesse processo, as AgNP foram

depositadas e foi retirado o sobrenadante, onde estavam os íons citrato, seguido da redispersão das AgNP em água deionizada. A centrifugação reduziria consideravelmente a quantidade de íons citrato. Observa-se na Figura 25(b), o sinal das bandas Raman atribuídas ao íon citrato para dois ciclos de centrifugações de uma suspensão coloidal de Ag aumentou. Essa melhora pode ser porque, com as centrifugações, aglomerados de AgNP em que os íons citrato estão localizados podem ter sido formados. Assim, a melhora no sinal pode ser em decorrência dos íons citrato estarem localizados na área relativa aos *hot spots*. Dessa forma, a centrifugação das AgNP não se mostrou uma alternativa viável para viabilizar o uso como substrato SERS na detecção de uma molécula. A literatura emprega o uso de íons iodeto para remover os íons citrato da superfície das AgNP (XU et al., 2014, 2015). Apesar de sanar as interferências nos espectros SERS, optamos por não realizar este procedimento. A troca do íon iodeto por citrato pode induzir a formação de pequenos agregados, acarretando diferentes arranjos que mudariam o objetivo deste trabalho.

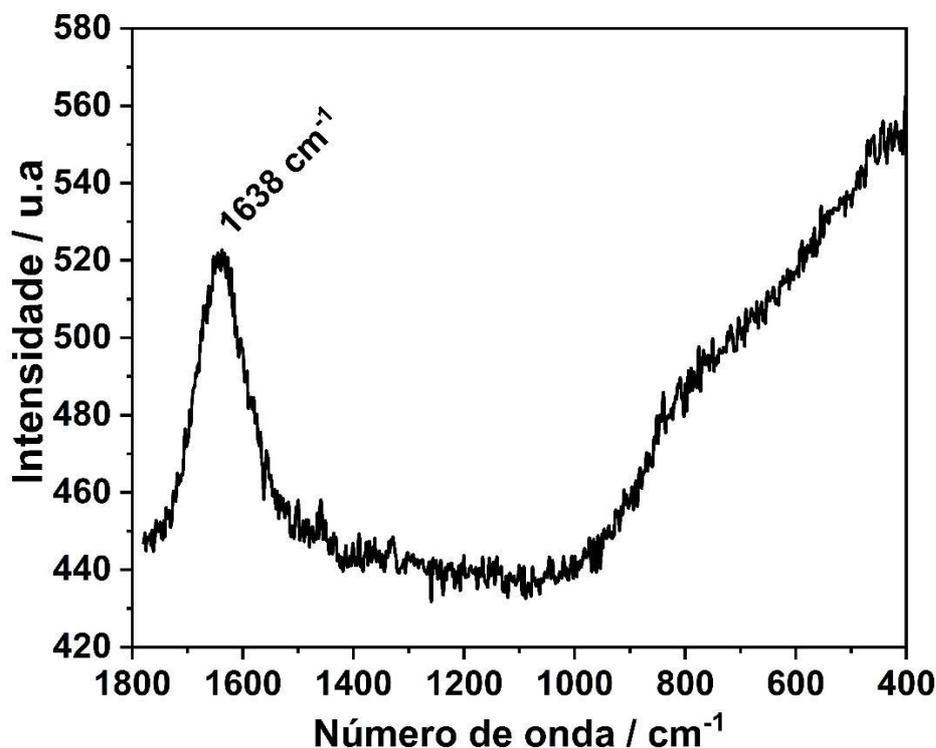
Figura 25- Espectros SERS obtidos da suspensão coloidal (a) sem centrifugação e (b) dois ciclos de centrifugação.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para contornar as interferências que inviabilizariam a obtenção de espectros SM-SERS do 4-HMB, buscou-se um substrato SERS que não apresenta sinal na mesma região do adsorbato. Assim, foi proposto trabalhar com AgNP sintetizadas pela redução da Ag^+ com NaBH_4 (procedimento de preparação na seção 3.2.2). As AgNP são estabilizadas pelos íons borato, BO_3^- , que se adsorvem fracamente na superfície das nanopartículas, gerando repulsões eletrostáticas entre estas e estabilizando a suspensão coloidal. A Figura 26 mostra o espectro do substrato SERS obtido na proporção 1:1 (coloide de Ag: água), com ajuste de pH para 4 com HCl. Nota-se o aparecimento de uma banda de baixa intensidade em 1638 cm^{-1} referente à água da solução, atribuída à deformação angular da água (PIRONON et al., 2007; RUIZ PESTANA et al., 2017). Não se notam bandas Raman além dessa no espectro obtido. Assim sendo, essa preparação de AgNP com boroidreto de sódio foi utilizada para a obtenção do espectro SM-SERS.

Figura 26- Espectro do substrato SERS na proporção 1:1 v:v (coloide de Ag : água) em pH=4.



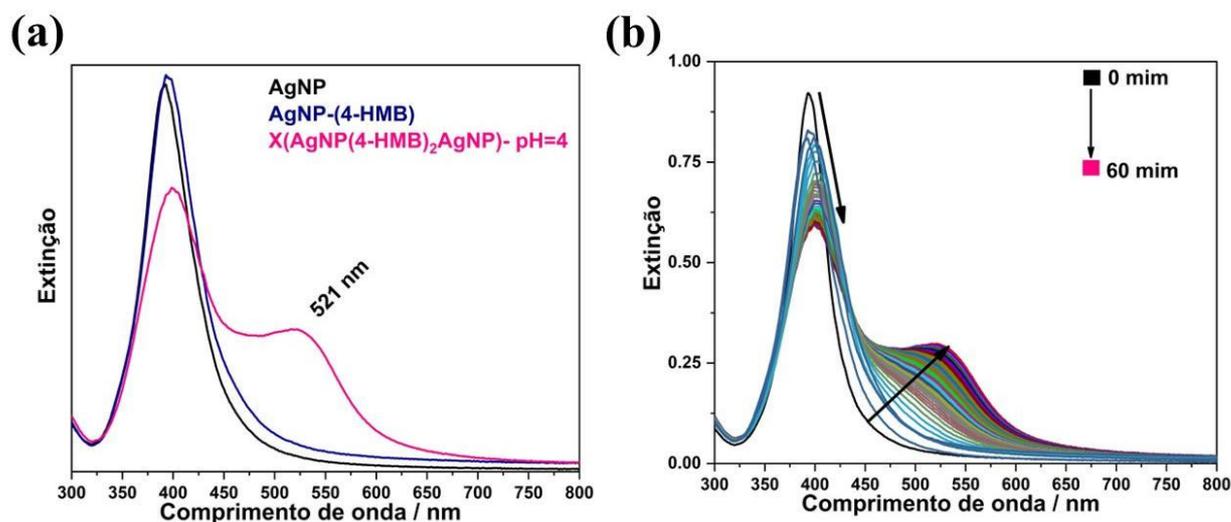
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.4.2 Estudos para verificar a formação de agregados automontados induzidos pela estrutura dimérica de 4-HMB

Já foi mencionado na seção 4.2 sobre a possibilidade do 4-HMB adsorvido em AgNP desencadear a automontagem (agregação controlada) entre diferentes AgNP por ligações de hidrogênio entre os grupos carboxilas do 4-HMB em pH=4. Buscando compreender essa abordagem realizamos uma série de análises para verificar a formação das ligações de hidrogênio induzindo *hot spots*, que discutiremos abaixo.

Na Figura 27(a) são exibidos os espectros de extinção da suspensão de AgNP e da mistura das AgNP com uma solução de 4-HMB $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em pH=4 e pH=6 (sem a acidificação do meio). A solução foi preparada na proporção 1:1 v:v da suspensão de AgNP:solução de 4-HMB $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, resultando em uma concentração final de 4-HMB de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A banda LSPR da suspensão coloidal de AgNP foi visualizada em 392 nm. Por outro lado, no espectro da suspensão de AgNP misturada com uma solução de 4-HMB, podemos observar um deslocamento para maiores comprimentos de onda de 3 nm devido à adsorção da molécula 4-HMB na superfície da Ag. O deslocamento da banda de extinção foi pequeno em decorrência da pequena variação no índice de refração local próximo a superfície com a adsorção do 4-HMB.

Figura 27- (a) Espectro de extinção do AgNP comparado ao 4-HMB $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ adsorvido em AgNP e após a adição de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ((AgNP(4-HMB)₂AgNP)) para ajustar o pH para 4 e (b) evolução do espectro UV-VIS de 4-HMB ($5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) adsorvido em AgNP após a adição de $50,0 \mu\text{L}$ de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo.

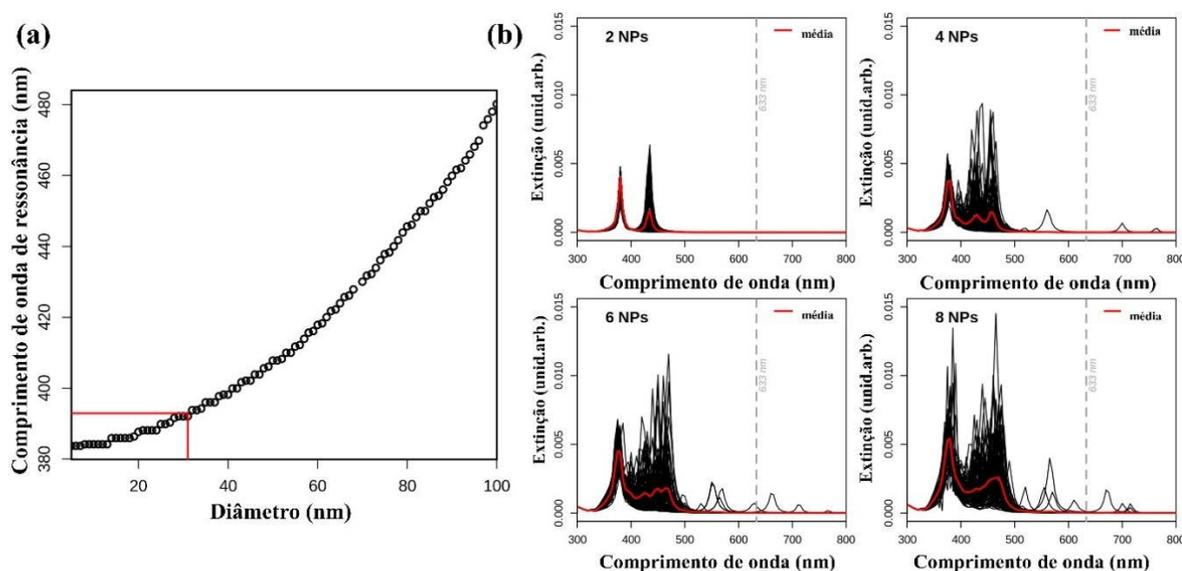


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A mudança na acidez da suspensão coloidal para pH=4 induziu a protonação da maioria das moléculas de 4-HMB, visto que o pK_a do grupo carboxila é 4,79 (PHAN; HAES, 2018; WEI et al., 2016). Assim, acompanhamos a evolução temporal dos espectros UV-VIS da mistura de AgNP e 4-HMB após a adição de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ como mostrado nas Figura 27(a) e (b). Vale ressaltar, que foi adicionado uma quantidade de HCl suficiente para alterar o pH da suspensão para 4,0, abaixo do valor de pK_a do 4-HMB. A suspensão coloidal foi monitorada por 60 min, obtendo-se um espectro de extinção a cada 1 min. Nota-se que a intensidade máxima da banda LSPR diminuiu com o tempo. Além disso, verifica-se o aparecimento de uma nova banda em 521 nm, que atinge sua intensidade máxima em torno de 60 min. Acredita-se que a protonação do 4-HMB seria então responsável por desencadear um processo de automontagem de AgNP (agregação) mediado por ligações de hidrogênio entre grupos carboxila de 4-HMB em diferentes AgNP. A agregação induzida poderia, consequentemente, ser responsável pela nova banda observada nos espectros UV-VIS. Para apoiar esta interpretação, também estudamos o sistema por cálculos teóricos baseado na teoria de Mie generalizada (TMG). Através da simulação eletrodinâmica clássica usando TGM o diâmetro das NP foi determinado por um ajuste do comprimento de onda de ressonância pelo diâmetro como apresentado na Figura 28(a). Para a banda LSPR em 392 nm observado na Figura 27(a),

o diâmetro das AgNP na simulação corresponde a 30 nm, sendo condizente com o observado pela análise de DLS na seção 4.4.1. Os espectros teóricos de extinção para os agregados gerados aleatoriamente com dímero de 4-HMB contendo diferentes números de AgNP foram obtidos e os resultados estão resumidos na Figura 28(b). O tamanho da AgNP utilizado na construção desses agregados foi de 30 nm. É importante salientar que na Figura 28(b) agregados de AgNP cada vez maiores acarretaram o deslocamento do máximo de extinção para maiores comprimentos de onda. Assim, pode ser considerado nos espectros de extinção experimentais das AgNP uma combinação das contribuições de diferentes tamanhos de agregados ocasionados pelo 4-HMB. Portanto, a observação da nova banda em 521 nm no espectro experimental é causada pela formação de grandes agregados de AgNP.

Figura 28- (a) AgNP de diâmetro de 30 nm foram obtidas a partir do ajuste de comprimento de onda de ressonância versus diâmetro por simulação via eletrodinâmica clássica usando a TMG e (b) simulação dos espectros de extinção para diferentes agregados formados aleatoriamente por AgNP de 30 nm.

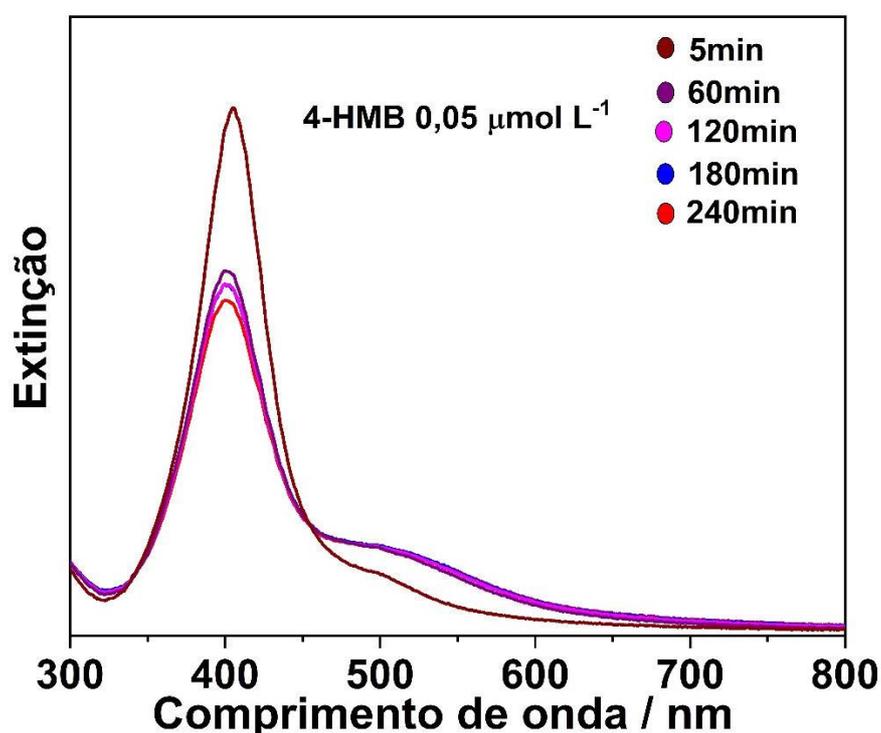


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para verificarmos se os agregados de AgNP automontados com 4-HMB $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ atingiu o estado estacionário em tempo maiores que 60 min, monitoramos o agregado de AgNP por 240 min obtendo um espectro de extinção a cada 60 min conforme mostrado na Figura 29. Nota-se que os agregados automontados continuaram a crescer lentamente ao longo

do intervalo de tempo de 60 a 240 min, sem desvio para o vermelho ou precipitação. No entanto, o crescimento parece ser mínimo em comparação com a evolução do tempo na faixa inicial de 0-60 min conforme exibido na Figura 27(b). Dessa forma, a evolução dos agregados AgNP não inviabiliza as análises SERS.

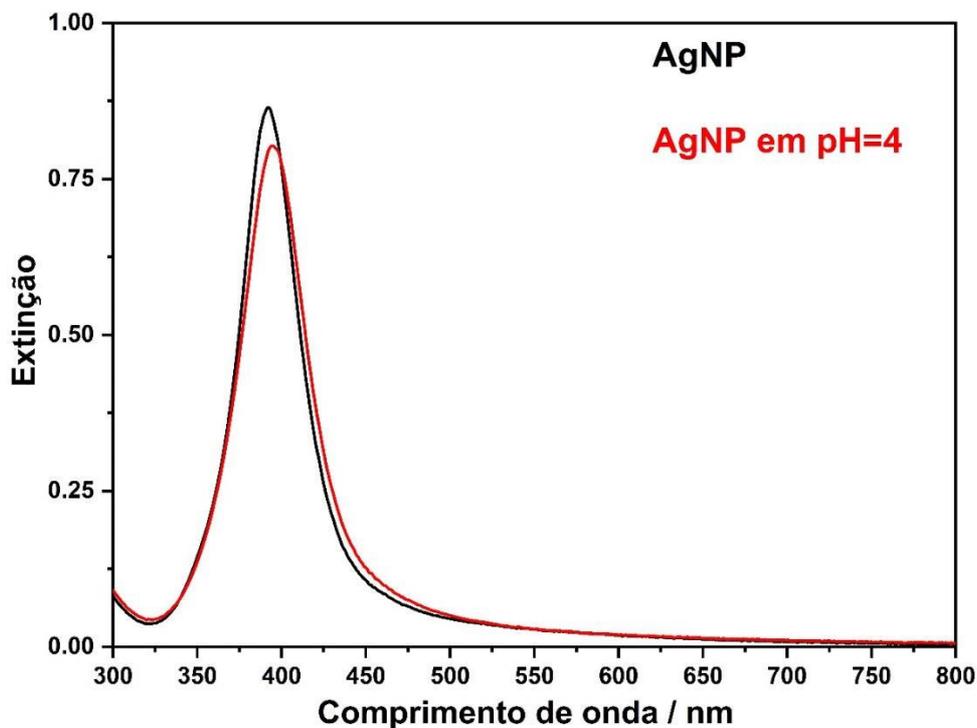
Figura 29- Evolução dos espectros UV-Vis do 4-HMB ($5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) adsorvido em AgNP após a adição de 50,0 µL de HCl 0,1 mol L⁻¹ em função do tempo.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Como prova de conceito sobre a importância da agregação de 4-HMB e ligação de hidrogênio AgNP, experimentos semelhantes também foram realizados em meio ácido na ausência de 4-HMB. A Figura 30 mostra os espectros de extinção das AgNP comparado a AgNP após a adição HCl, ajustando o pH=4. É possível observar que a presença do ácido forte não levou a alteração espectral pronunciada como verificada na Figura 27(b). Dessa forma, inferimos que a adição de um ácido forte não acarretou a agregação de AgNP. Esses resultados forneceram evidências adicionais para a formação eficiente de agregados automontados por 4-HMB.

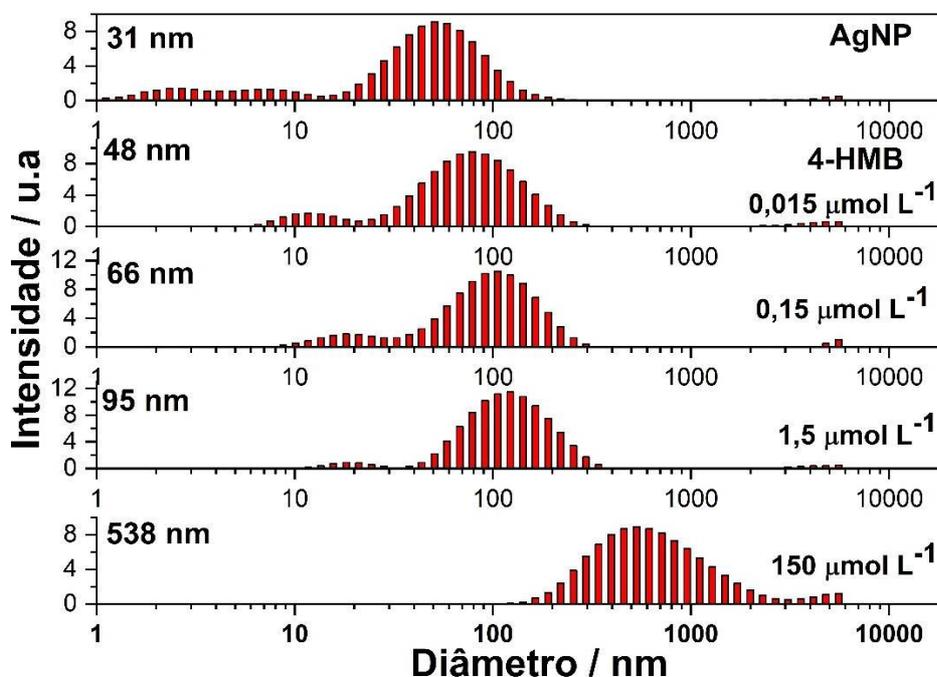
Figura 30- Espectro de extinção de AgNP comparado aAgNP após a adição de 5 μ L de HCl 0,1 mol L⁻¹ (pH=4).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A extensão da agregação causada por 4-HMB em pH=4 foi estudada por DLS, em que foram avaliadas diferentes concentrações de 4-HMB na suspensão coloidal de Ag com o pH=4 comparando com a suspensão de AgNP. O conjunto de resultados das análises de diâmetro hidrodinâmico encontra-se resumido na Figura 31. Os resultados de DLS permitiram uma análise completa do tamanho dos agregados em toda a amostra, assemelhando à condição real em que o sistema se encontrava. Conforme mostrado na Figura 31, existe uma relação entre a concentração de 4-HMB e o tamanho dos agregados de AgNP. É notável a relação da concentração de 4-HMB com os tamanhos dos agregados de AgNP. Concentrações maiores de 4-HMB resultaram em diâmetros médios maiores, ou seja, maiores agregados de AgNP. Dessa forma, a análise DLS acrescentou evidências de que o grupo carboxila protonado do 4-HMB é responsável pelos agregados automontados de AgNP em suspensão.

Figura 31- Distribuição de tamanho de AgNP em função da concentração de 4-HMB obtida a partir da análise DLS comparado com resultado obtido para AgNP sem qualquer adição de 4-HMB. O tamanho médio medido é representado em cada análise.

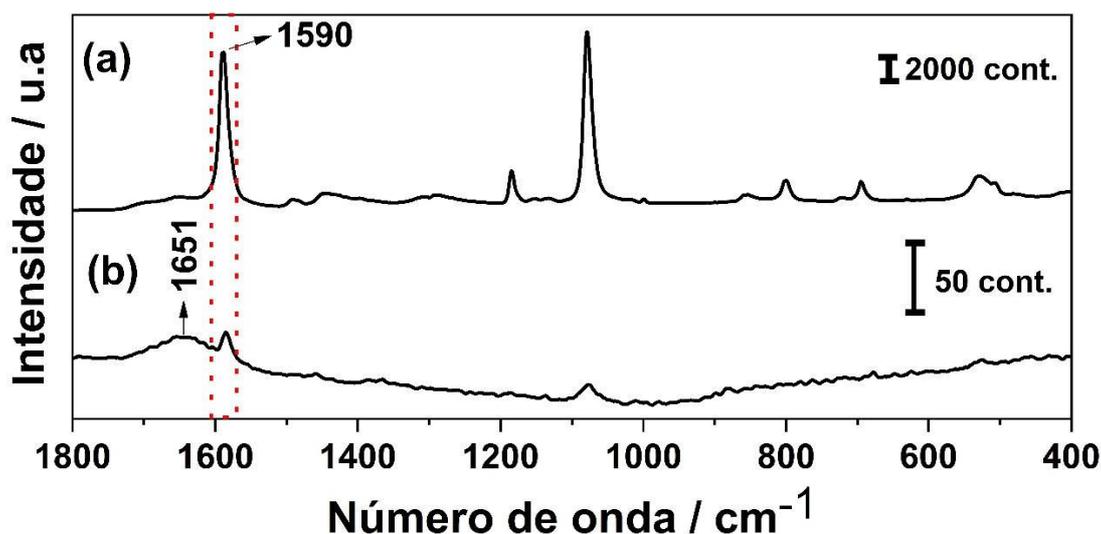


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Os resultados anteriores fornecem indícios que o ajuste do pH do meio induziu a dimerização de 4-HMB adsorvida em AgNP, e conseqüentemente, a formação de agregados de AgNP (*hot spots*). Dessa forma, foi verificada a dependência do sinal SERS de 4-HMB $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em pH=4 em comparação com o meio sem adição de HCl, que apresenta pH=6. Os espectros SERS médios das suspensões são exibidos nas Figura 32(a) e (b), respectivamente. Pode-se notar na Figura 32(a) um grande aumento de intensidade no espectro SERS médio na presença de HCl, em relação ao espectro sem HCl (Figura 32(b)). Além disso, as bandas características do 4-HMB na Figura 32(b) foram observadas com intensidade muito baixa, como é possível verificar pela relação de intensidade com a banda água em 1651 cm^{-1} (PIRONON et al., 2007). A razão de intensidade para a banda SERS em 1590 cm^{-1} nos espectros na presença de HCl para os espectros na ausência do ácido foi de *ca.* 280. Essa grande mudança de intensidade pode ser tomada como evidência da formação de agregados automontados induzidos por ligações de hidrogênio entre moléculas de 4-HMB protonadas adsorvidas na superfície de AgNP. Isso ocorre porque a formação de aglomerados induziria o acoplamento

LSPR entre AgNP próximas e, portanto, a geração de *hot spots* (região em que 4-HMB encontra-se centrado), o que pode aumentar muito o efeito de intensificação Raman.

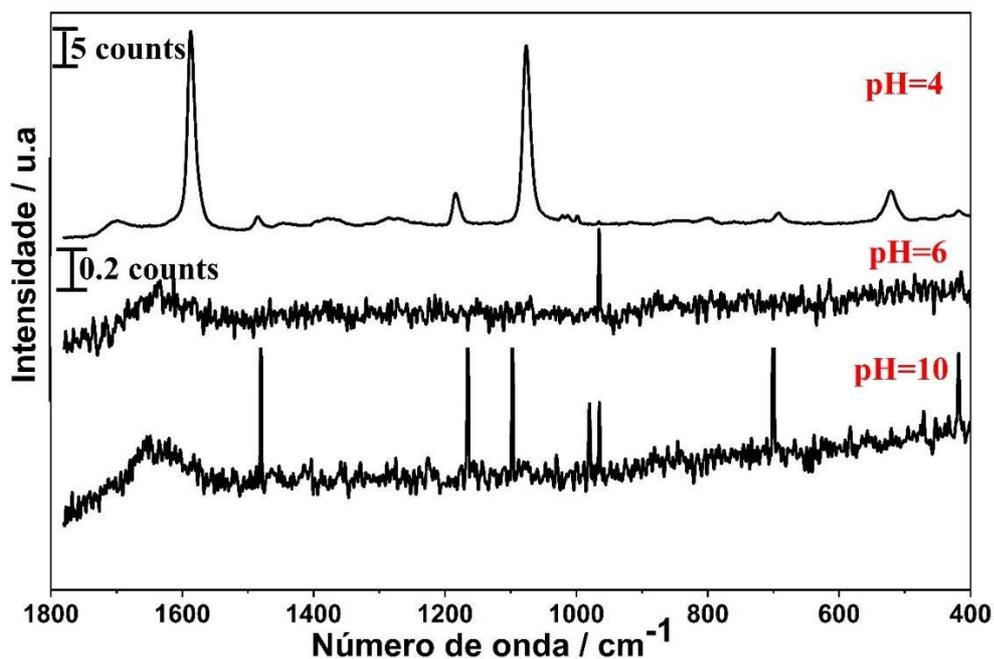
Figura 32- Comparação entre o espectro SERS médio experimental de 4-HMB $5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} em (a) pH=4 e (b) pH=6 (sem adição de HCl).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A fim de acrescentar mais evidências de que o aumento adicional da intensidade SERS seria realmente devido à formação dos agregados de AgNP induzidos por ligação de hidrogênio do 4-HMB, foi proposta uma comparação experimental das intensidades de SERS do 4-HMB na concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} em pH= 9, 6 e 4. A Figura 33 estão os espectros SERS médios referente ao 4-HMB adsorvido em AgNP em pH= 9, 6 e 4. É possível notar na Figura 33 que o espectro SERS médio em pH=4 apresenta bandas fortes associado à assinatura vibracional do 4-HMB. Por outro lado, nos espectros em pH=6 e 9, ambos acima do valor de pK_a do grupo carboxila do 4-HMB ($pK_a=4,79$) (WEI et al., 2016), as bandas associadas ao 4-HMB não são observáveis. É possível verificar apenas a banda de baixa intensidade associada a água em 1651 cm^{-1} conforme mostrada na Figura 33 em pH=6 e 9 (PIRONON et al., 2007). Portanto, os resultados dão indícios que o ajuste de pH da suspensão de 4-HMB/AgNP para 4 acarreta a formação de *hot spots* induzidos por ligação de hidrogênio entre moléculas de 4-HMB adsorvidas em diferentes AgNP.

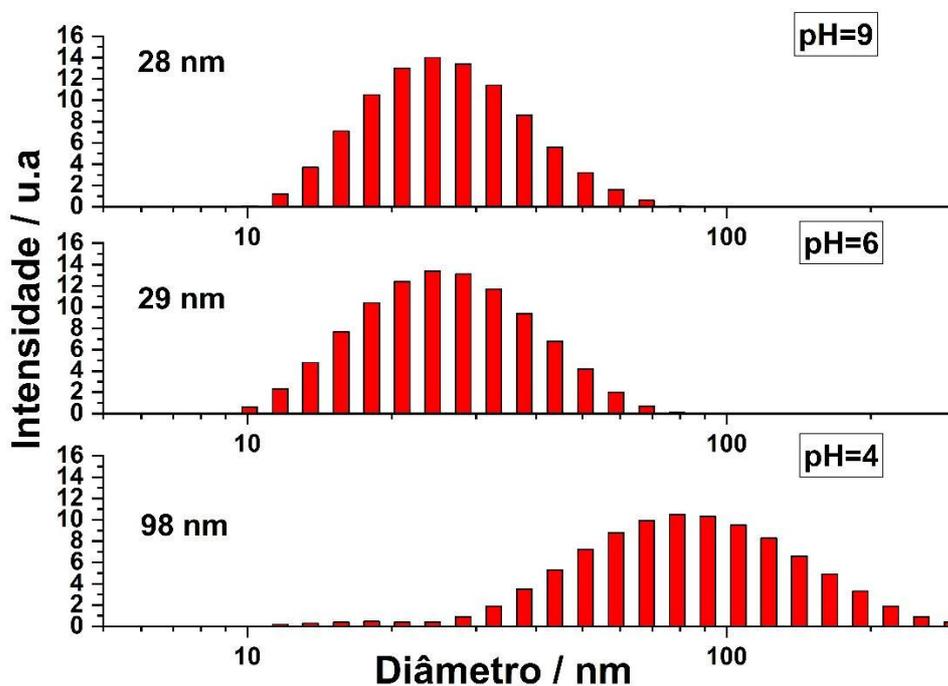
Figura 33- Dependência do sinal SERS médios de 4-HMB adsorvidos em AgNP em pH=9, 6 e 4.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Medidas de DLS foram realizadas para analisar o estado de agregação da suspensão coloidal contendo 4-HMB na concentração de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em pH= 9, 6 e 4. Os resultados obtidos estão resumidos na Figura 34. Nota-se que o diâmetro médio para AgNP variou de 29 e 28 nm em pH= 6 e 9, respectivamente. Por outro lado, em pH=4 o diâmetro médio foi de 98 nm. A observação de que o diâmetro médio de AgNP foram próximos em pH acima do pK_a e em pH abaixo do pK_a ocorreu um aumento de tamanho adicionou evidências de que o grupo carboxila protonado de 4-HMB foi responsável pela geração dos agregados automontados de AgNP em suspensão. Os resultados das análises de DLS são condizentes com ausência das assinaturas vibracionais pH=9 e 6 apresentados na Figura 33.

Figura 34- Distribuição de tamanho de AgNP medidos por DLS em pH=9, 6 e 4, respectivamente. O tamanho médio medido é representado em cada análise.

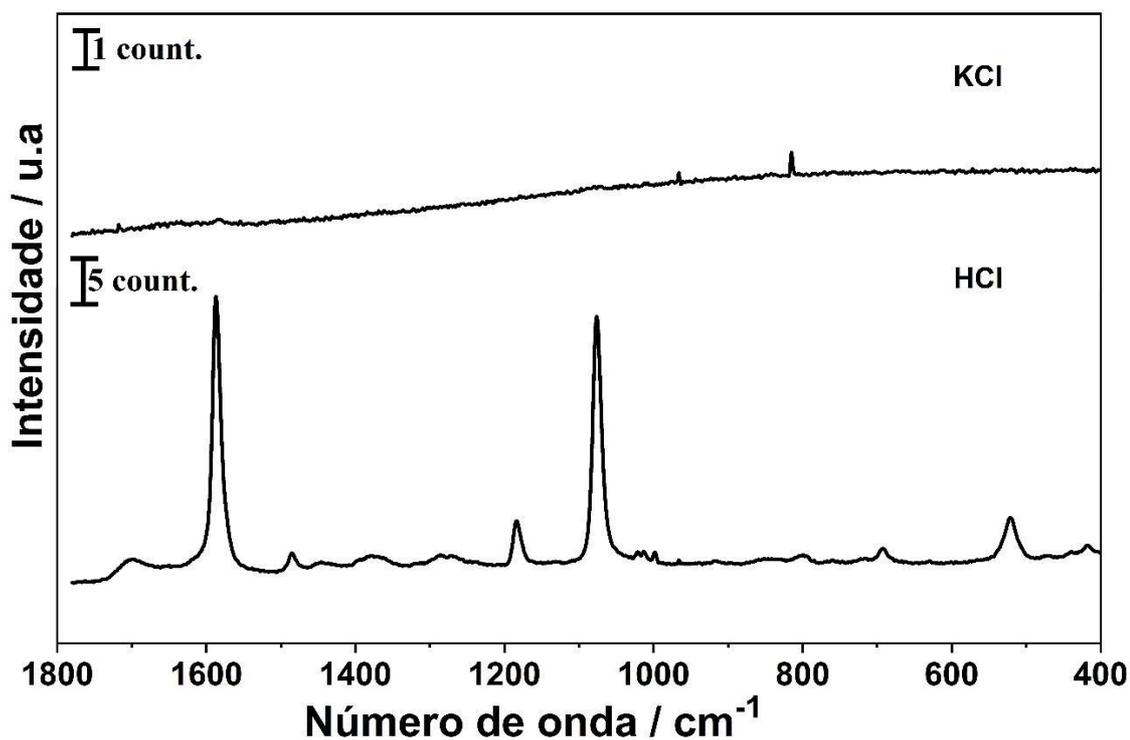


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Está bem estabelecido na literatura que a agregação pode ser induzida por eletrólitos, como sais de íons cloreto, em uma suspensão coloidal (DARBY; LE RU, 2014). Dessa forma, para compreender e esclarecer que o aumento do sinal SERS para 4-HMB oriunda da agregação de AgNP poderia vir dos íons Cl^- provenientes da solução de HCl em vez da formação de *hot spots* impulsionados por ligações de hidrogênio, o espectro SERS de 4-HMB foi obtido usando KCl como agente agregador. Para comparação foi mantido constante a concentração final de íons Cl^- , sendo equivalente a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Essa concentração de íons cloreto corresponde à que foi utilizada para ajustar o pH para 4 com HCl. Os espectros SERS médio do 4-HMB na concentração $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de HCl e KCl são representados na Figura 35. Pode-se notar que, na presença de KCl, as bandas características do 4-HMB dificilmente foram observadas. Sabe-se da literatura que a maioria dos estudos SERS em concentrações baixas de adsorbatos trabalham com uma concentração de 10 mmol L^{-1} para pré-agregar as NP, o que é ideal para produzir grandes fatores de intensificação SERS (DARBY; LE RU, 2014). Entretanto, na abordagem utilizada a concentração final de íons cloreto é inferior ao que é reportado na literatura. Assim, apesar dos íons cloreto substituírem a camada superficial de borato, acredita-se que não causam agregação do coloide em grande extensão, ou seja, não

acarretam a formação de grandes aglomerados de AgNP. Entretanto, mesmo que tivessem sido formados pequenos agregados na presença de KCl, teriam sido gerados *hot spots* aleatórios (DOS SANTOS; TEMPERINI; BROLO, 2019; SANTINOM et al., 2018). Dessa forma, há uma baixa probabilidade de encontrar um número razoável de moléculas adsorvidas dentro de *hot spots* e, conseqüentemente, não seria suficiente para a detecção do sinal SERS em baixas concentrações. Por outro lado, o uso de 4-HMB para induzir a formação de *hot spots* eficientes para SERS resultaria em uma condição em que o 4-HMB estaria adsorvido na região de maior campo elétrico. Conseqüentemente, este resultado reforça que o sinal SERS em meio ácido vem de 4-HMB em *hot spots* induzidos por ligações de hidrogênio.

Figura 35- Espectros SERS médio de 4-HMB na concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com a adição de KCl e HCl em concentrações equivalentes de íons cloreto 2,5 mmol L⁻¹. A 2,5 mmol L⁻¹ dos íons cloreto é correspondente ao ajuste de pH=4.

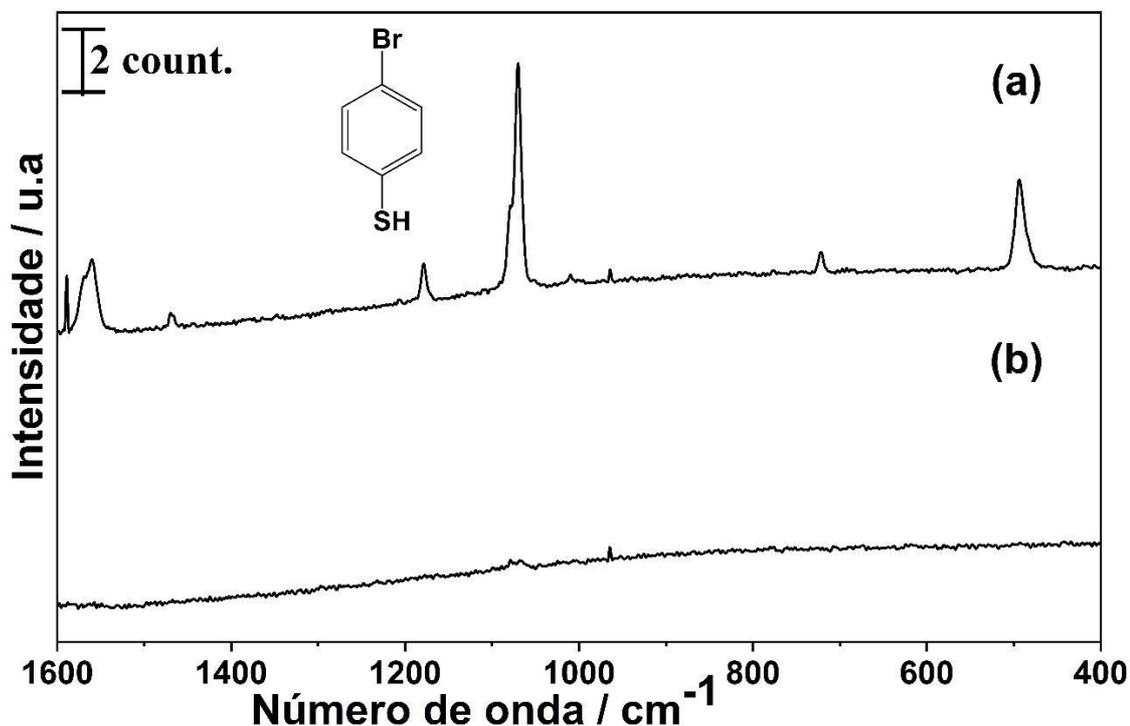


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Até o momento foram mostradas evidências da formação dos agregados de AgNP por ligações de hidrogênio. Como teste adicional, o sinal SERS da molécula 4-bromobenzenotiol (4-BrBT), estrutura apresentado no inserto da Figura 36 foi estudado sob as mesmas condições

espectrais e de concentração utilizadas para o 4-HMB. O interesse em estudar o 4-BrBT foi em decorrência da semelhança da estrutura química em relação ao 4-HMB, diferindo na troca do grupo -COOH pelo -Br. Assim, 4-BrBT não apresenta grupo funcional capaz de fazer ligações de hidrogênio quando adsorvido em AgNP. Os espectros SERS médios do 4-BrBT nas concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ são mostradas nas Figura 36(a) e (b), respectivamente. Nota-se que na Figura 36(a) o espectro SERS do 4-BrBT com bandas equivalentes ao que já foi relatado na literatura (JUN et al., 2011). Ainda mais, o sinal SERS foi observado com boa relação sinal-ruído. Por outro lado, ao diminuir a concentração de 4-BrBT para $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ não foi observada nenhuma banda atribuível ao 4-BrBT (Figura 36(b)). Embora as condições experimentais e o agente de agregação (HCl) fossem os mesmos, nota-se que o aumento da intensidade SERS para 4-BrBT foi claramente menor quando comparada ao 4-HMB. Uma explicação razoável para essa observação seria uma menor extensão de agregação ocasionada pelo HCl, o que resulta em moléculas de 4-BrBT em *hot spots* um evento raro ou mesmo a ausência de *hot spots* suficiente para permitir observar as bandas características do 4-BrBT. Além disso, o 4-BrBT não apresenta um grupo funcional capaz de induzir uma dimerização na molécula, que poderia levar à formação de agregados automontados.

Figura 36- Espectros SERS médios de 4-BrBT no regime de concentração (a) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e (b) $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Inseto da Figura 35(a) mostra a estrutura química do 4-BrBT.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

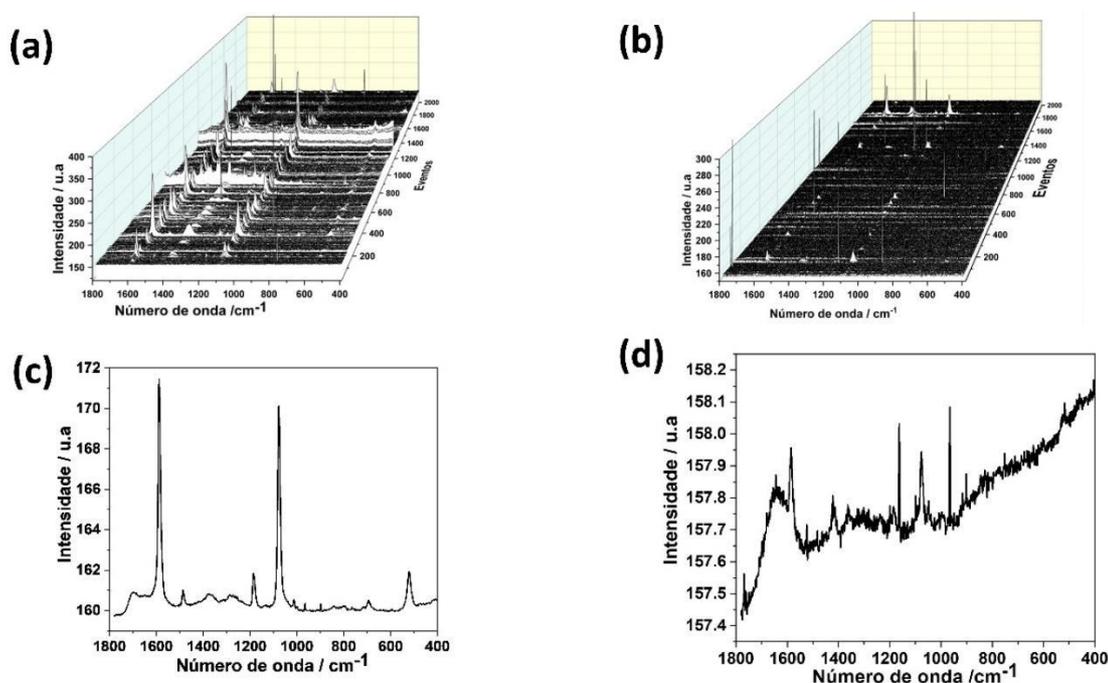
4.4.3 Estudo da obtenção dos espectros SERS do 4-HMB no regime de uma ou poucas moléculas

A abordagem empregada para a construção dos agregados automontados com 4-HMB, molécula que não é ressonante sob a excitação 632,8 nm, demonstrou-se resultar em uma intensificação SERS de excelente potencial. Nesse intuito, para verificarmos os limites de detecção do sinal SERS, foram obtidos espectros SERS no regime de uma ou poucas moléculas de 4-HMB adsorvidas em AgNP em pH=4.

Nas Figura 37(a) e (b) são apresentados 2000 espectros SERS do 4-HMB em um tempo de aquisição 0,1 s por espectro, contendo no volume confocal 32 (5×10^{-8} mol L⁻¹) e 2 ($3,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹) moléculas, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 37(a), na maioria dos espectros estão presentes as bandas características do 4-HMB, ocorrendo variações consideráveis na intensidade SERS entre os espectros. Todavia, nos espectros SERS no regime de 2 moléculas (Figura 37(b)), foram observadas flutuações temporais mais drásticas, entre a

ausência completa e a presença de sinal SERS da molécula de interesse. A maioria dos eventos exibidos apresentaram intensidades nula ou muito baixa das bandas do 4-HMB. A extinção momentânea do espectro SERS pode ser decorrente da ausência do 4-HMB na região de *hot spots* e a ausência de *hot spots* (contendo 4-HMB) no volume confocal. Portanto, as flutuações drásticas de intensidade em concentrações extremamente baixas são características do regime SM-SERS e são, portanto, indicativas de que SM-SERS foi alcançada para 4-HMB.

Figura 37- 2000 espectros SERS obtidos do 4-HMB no regime de (a) 32 moléculas e (b) 2 moléculas contida no volume confocal; Espectros SERS médios correspondentes (c) 32 moléculas e (d) 2 moléculas.



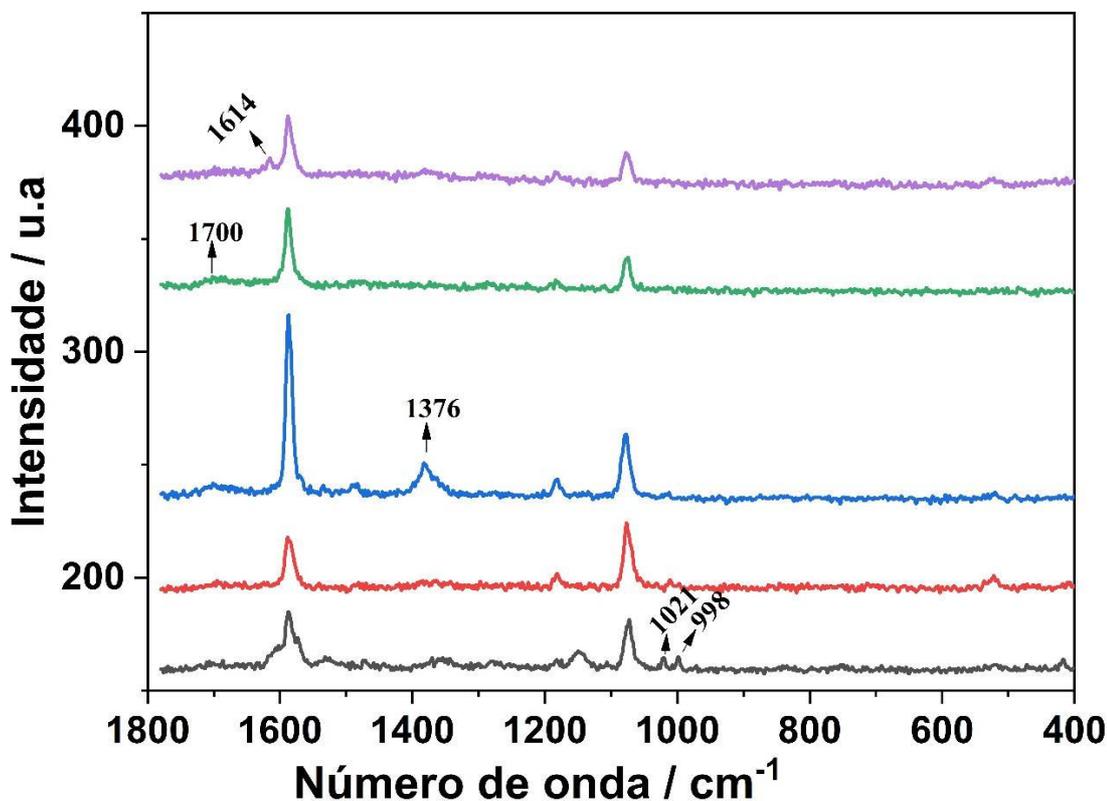
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As Figura 37(c) e (d) exibem os espectros SERS médio das Figura 37(a) e (b) correspondentes a 32 e 2 moléculas presentes em média no volume confocal, respectivamente. No espectro SERS médio para o regime de 2 moléculas mostrada na Figura 37(d), nota-se a presença das duas bandas mais intensas do espectro SERS de 4-HMB localizada em 1590 e 1078 cm^{-1} . Essas bandas foram observadas com baixa intensidade, mas ambas as bandas tiveram intensidades equivalentes à banda da água em 1638 cm^{-1} . Este resultado indica que o sinal SERS médio da suspensão do 4-HMB em meio ácido vem da geração de *hot spots*. Já na Figura 37(c) foram observadas bandas que não haviam sido notadas no espectro de

monocamadas de 4-HMB (Figura 32(a)). As bandas localizadas em 998, 1021 e 1376 cm^{-1} são bandas relativamente fracas. A banda em cerca de 1376 cm^{-1} atribuída a vibração do (COO^-) pode ser um indicativo da presença de grupos COO^- adsorvidos na superfície AgNP. Em pH abaixo do pK_a , o equilíbrio químico é deslocado para a protonação do grupo carboxila. No entanto, um pequeno número de espécies desprotonadas estaria presente na solução. Isso sugere que no regime de baixa concentração, onde não há impedimento estérico, esse pequeno número de grupos carboxila desprotonados pode adsorver em AgNP. Por outro lado, as bandas em 998 e 1021 cm^{-1} são características de derivados monossustituídos de benzeno (CHARKOVA; ZDANIAUSKIENĖ, 2020). Essas três bandas foram observadas nos espectros SERS do tiofenol adsorvido em eletrodos de Ag reportado na literatura (MICHOTA; BUKOWSKA, 2003). Assim, acredita-se que esteja ocorrendo a descarboxilação durante a adsorção do grupo carboxila desprotonado na superfície do AgNP em pequena proporção, levando à formação de tiofenol. Outra hipótese, para a observação das bandas citadas poderia ser em decorrência de traços de tiofenol presentes na amostra de 4-HMB.

A Figura 38 exibe 5 espectros SERS individuais selecionados dos espectros SERS mostrados na Figura 37(a). É evidente, em alguns desses eventos SERS, tanto o sinal atribuído ao tiofenol como o do grupo carboxila desprotonado. Ainda mais, foi possível observar em alguns desses eventos as bandas ($\text{C}=\text{O}$) associadas aos agregados automontados e estrutura independente do 4-HMB. A análise individual sugere um sistema complexo no qual estão presentes as misturas das estruturas automontadas e independentes de 4-HMB adsorvidos em AgNP, juntamente com moléculas de 4-HMB adsorvidas pelo grupo carboxila e até mesmo a formação do tiofenol. No entanto, acredita-se que o sinal SERS de diferentes configurações de moléculas só foi evidenciado por estarem centralizados na região de *hot spot* gerada pelo 4-HMB. Ainda mais, é possível verificar um aumento de intensidade em algumas bandas que podem estar associadas ao maior número de agregados formados por 4-HMB (DOS SANTOS; TEMPERINI; BROLO, 2016).

Figura 38- Representação de 5 espectros SERS individuais selecionados de 2000 espectros obtidos para moléculas de 4-HMB $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ em pH=4.

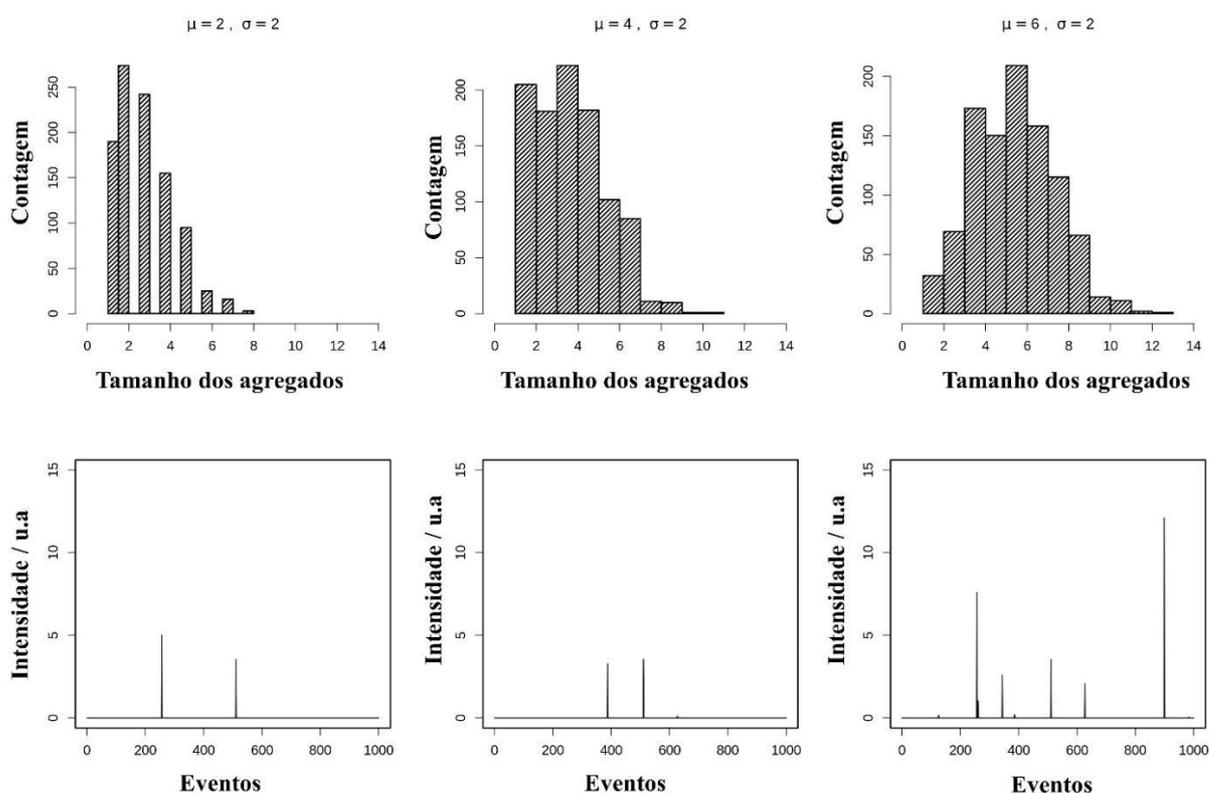


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As fortes flutuações temporais de intensidades observadas nos espectros SERS individuais exibidos na Figura 37(b) podem ser atribuídas à geração dinâmica de *hot spots* formadas pela junção molecular do grupo carboxila por ligações de hidrogênio entre moléculas de 4-HMB em AgNP adjacentes (ANDRADE et al., 2012; DOS SANTOS, 2020; DOS SANTOS; TEMPERINI; BROLO, 2019; VILLA et al., 2020). Para um melhor entendimento da dinâmica dos *hot spots* nas flutuações de intensidade em diferentes regimes de concentração de 4-HMB, foram realizadas simulações baseadas na TMG. As simulações TMG foram realizadas em diferentes tamanhos de agregados de AgNP para obtermos as intensidades do SERS. O objetivo dessa abordagem foi assemelhar ao comportamento experimental no qual o efeito observado de aumentar a concentração de 4-HMB permitiu interpretar que o aumento da concentração molecular levou a maiores probabilidades de formação de ligações de hidrogênio conectando diferentes partículas, fazendo que o tamanho médio dos agregados de AgNP aumenta na dispersão coloidal. As simulações foram geradas para 1000 eventos de agregados

aleatório com diferentes distribuições de agregados de AgNP, cujo tamanho é normalmente distribuído com média $\mu=2, 4$ ou 6 nanopartículas e com desvio padrão σ . A simulações das intensidades SERS foram obtidas no centro dos *hot spots*. Os resultados das simulações são mostrados na Figura 39. Com base nas simulações, os resultados mostraram para uma distribuição média entre $\mu=2$ ou 4 agregados de AgNP que as intensidades SERS estão abaixo da LSPR com a linha de excitação $632,8$ nm, o que inviabiliza a detecção do sinal SERS (ver Figura 39). Em contrapartida para distribuições médias contendo agregados maiores $\mu=6$ um número maior de eventos acima do limiar de intensificação é observado. Dessa forma, os agregados de NP estariam em ressonância com a linha de excitação e, portanto, forneceriam os maiores fatores de intensificação SERS, possibilitando a detecção experimental do adsorbato. Tal interpretação aponta para a possibilidade de utilizar essa abordagem como uma forma experimental de controlar o tamanho médio dos agregados de AgNP produzindo *hot spots* mais eficientes para uma determinada fonte de excitação.

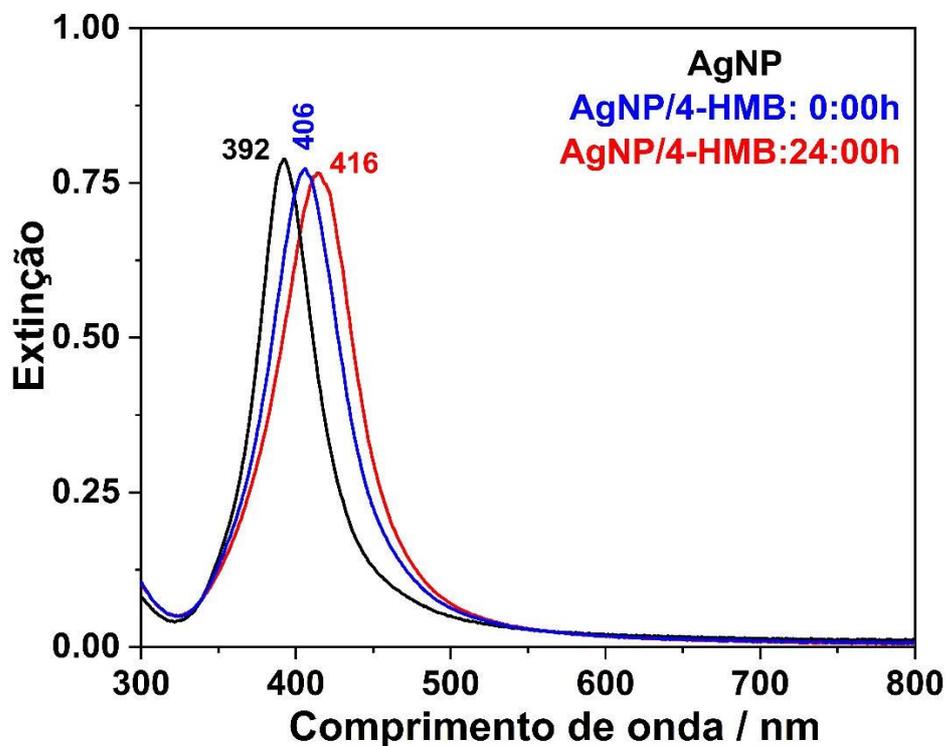
Figura 39- Simulação das intensidades SERS no centro *hot spot* para 1000 eventos gerados de agregados aleatório com diferentes distribuições de nanopartículas; normalmente distribuídos com média $\mu=2, 4$ ou 6 nanopartículas.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para avaliar a influência no tempo de adsorção do grupo tiol gerado pela cisão da ligação SH na superfície da AgNP foram obtidos os espectros UV-VIS da AgNP e da mistura 1:1 de 4-HMB ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)/AgNP no tempo de 0h e 24h conforme mostrado na Figura 40. A banda LSPR das AgNP foi monitorada por ser sensível a mudanças no índice de refração. Na Figura 40 a banda LSPR das AgNP apresenta um máximo de extinção em 392 nm. Verificamos para o espectro de extinção da mistura de 4-HMB/AgNP obtido para o tempo 0h um deslocamento de 14 nm para maiores comprimento de onda, enquanto, para o tempo de adsorção de 24 h o deslocamento observado foi de 24 nm em relação as AgNP sem 4-HMB. Os deslocamentos das bandas LSPR para maiores comprimento de onda são indicativos da adsorção 4-HMB. Entretanto, notou-se para o tempo 24 h que o deslocamento da banda LSPR foi muito maior, implicando em um maior número de moléculas adsorvidas. Apesar da forte afinidade entre o grupo funcional tiol e a Ag, a taxa de adsorção foi lenta, provavelmente em função do pH da mistura ser 6. O grupo tiol tem pK_a acima de 6,8 (MILLOTTI et al., 2010). Portanto, nesse valor de pH da mistura 4-HMB/AgNP, o grupo tiol estaria presente principalmente na forma protonada, mas com presença não-desprezível da espécie desprotonada. Como o pH da mistura AgNP/4-HMB está abaixo do pK_a do grupo tiol, o processo de adsorção seria mais lento do que em situação de pH mais alto que esse valor. A fim de garantir maior reprodutibilidade dos espectros SERS em regime de concentrações ultrabaixo é necessário preparar a mistura 4-HMB/AgNP com 24h antecedência para garantirmos a maior adsorção para a ancoragem do 4-HMB e posteriormente induzirmos a formação dos agregados de AgNP em $pH=4$.

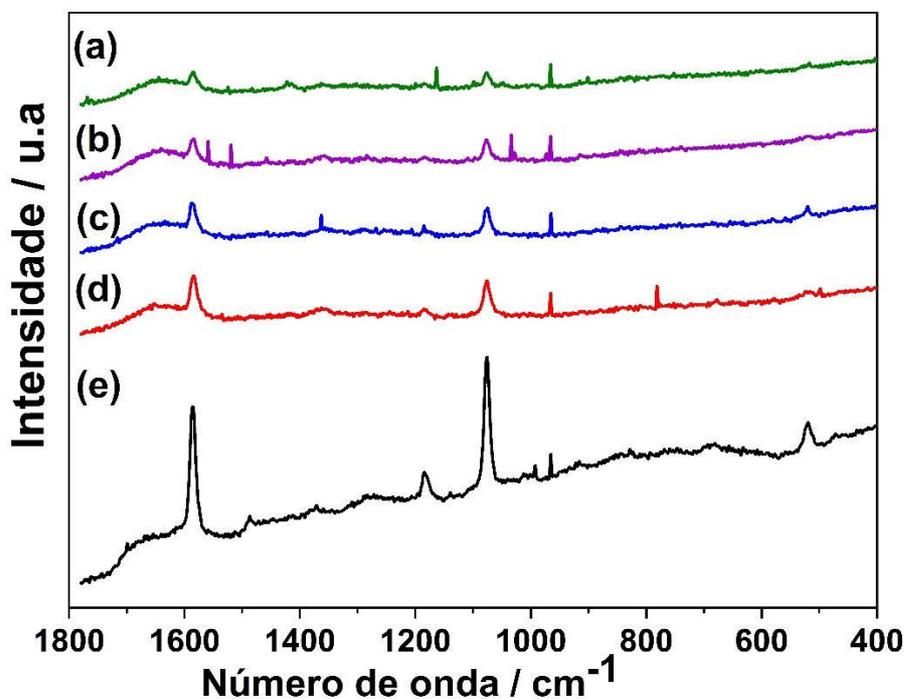
Figura 40- Espectros de extinção das AgNP e da mistura 1:1 de 4-HMB ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) /AgNP no tempo de 0h e 24h



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Na Figura 41 foram obtidos os espectros SERS médio aumentando o número de moléculas adsorvidas dentro do volume confocal, correspondendo a uma condição SERS de poucas moléculas adsorvidas na superfície da Ag. Para obtenção das médias dos espectros para concentrações de 4-HMB correspondentes a 2, 3, 4, 5 e 10 moléculas foram adquiridos 2000 espectros SERS individuais com tempo de aquisição 0,1 segundos. Verifica-se na Figura 41, se os espectros forem comparados, que à medida que o número de moléculas de 4-HMB aumenta, as intensidades das bandas em 1588 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} aumentam o que pode ser devido ao maior número de agregados formados.

Figura 41- Espectro SERS médio do 4-HMB em pH=4 no regime de (a) 2; (b) 3; (c) 4; (d) 5 e 10 moléculas de 4-HMB. A concentração no volume confocal é: 3×10^{-9} mol L⁻¹ (2 moléculas), $4,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (3 moléculas), 6×10^{-9} mol L⁻¹ (4 moléculas); $7,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (5 moléculas); $1,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (10 moléculas).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para um melhor entendimento dos *hot spots*, os dados SERS em baixas concentrações de 4-HMB foram investigados pelo método de Resolução de Curva Multivariada por Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS, do inglês, *Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares*). O MCR-ALS é um método de decomposição de uma matriz de sinais mistos D em termos de seus componentes puros, sendo eles o perfil de concentração (C), o perfil espectral (S) e a matriz de erro experimental (Er). Esse modelo pode ser descrito pela Equação 23 (DOS SANTOS, 2020).

$$D = CS^T + Er$$

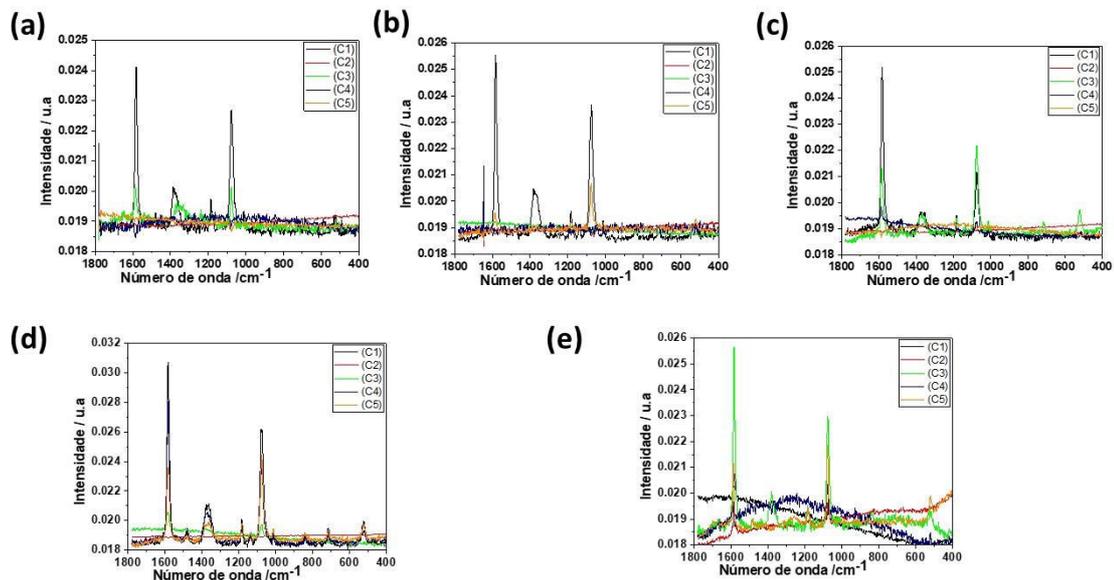
Equação 23

As linhas de S^T contêm os espectros fundamentais dos quais cada espectro em D deve ser recuperado por uma combinação linear. O algoritmo ALS é utilizado para buscar o resultado

que apresenta o melhor ajuste, gerando perfis finais de concentração C e espectral S , quando certo critério de convergência é atingido (MARÇO et al., 2014). Os espectros puros serão referidos como Componente 1 (C1), Componente 2 (C2), etc., para cada linha em S^T usada para descrever as colunas de C , que medem a contribuição de cada componente para descrever os espectros SERS (DOS SANTOS, 2020).

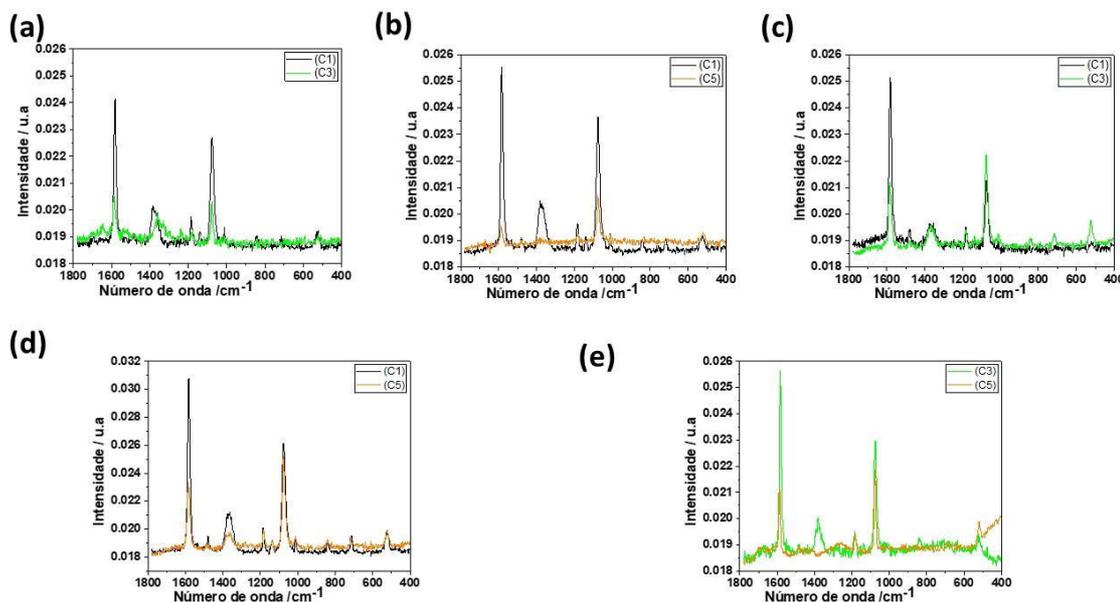
A Figura 44 resume a análise MCR-ALS gerados sobre os dados dos espectros SERS experimentais de 4-HMB no regime (a) 2; (b) 3; (c) 4; (d) 5 e (e) 10 moléculas (referente aos dados da Figura 41) e são representadas as cinco componentes recuperadas. As componentes MCR-ALS são apresentados em função do deslocamento Raman. Nota-se que as componentes apresentam perfeita correlação com o espectro SERS do 4-HMB apresentados na Figura 41. Como pode ser visto Figura 42, dentre os espectros puros é possível observar componentes com perfis de intensidade relativa diferentes em 1588 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} (ver Figura 43) que pode estar associado ao tamanho dos agregados de AgNP. Os *hot spots* formados pela junção molecular do 4-HMB pode gerar diferentes tamanhos médios de agregados de AgNP, ou seja, dímero, trímero, tetrâmero, etc de AgNP. Os agregados de dímero, trímeros e tetrâmeros apresentam LSPR em comprimentos de onda menores em relação a radiação incidente $632,8\text{nm}$, enquanto os agregados maiores a LSPR está deslocado para maiores comprimento de onda (Figura 28). Dessa forma, na suspensão coloidal ambos os arranjos podem estar presentes. Assim, na aquisição dos espectros SERS com a radiação incidente $632,8\text{nm}$ a ressonância do plásmon do dímero, trímero e tetrâmero estariam deslocados para maiores energia, o que poderia resultar no aumento da intensidade relativa da banda 1076 cm^{-1} em relação a banda em 1588 cm^{-1} . Por outro lado, nos agregados maiores a ressonância do plásmon seria deslocada para menores energia, o que explicaria a banda 1588 cm^{-1} ser mais intensa em alguns espectros. Portanto, a análise MCR-ALS fornece indícios de que, no regime de poucas moléculas, os perfis espectrais podem ser correlacionados com a distribuição dos comprimentos de onda de ressonância dos *hot spots*. Entretanto, para uma melhor interpretação dos dados, ainda é necessário realizar mais experimentos.

Figura 42- Espectros puros das componentes recuperadas pela análise de MCR-ALS obtidos dos espectros SERS experimentais de 4-HMB no regime (a) 2; (b) 3; (c) 4; (d) 5 e (e) 10 moléculas contidas no volume confocal.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 43- A contribuição de dois componentes que mostram a variação na intensidade Relativa das bandas 1588 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} dos espectros SERS experimentais de 4-HMB no regime (a) 2; (b) 3; (c) 4; (d) 5 e (e) 10 moléculas oriunda da Figura 41.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.4.4 Conclusões parciais

Após a preparação e caracterização de AgNP via redução por citrato ou boridreto e caracterização, verificou-se que o coloide de prata estabilizado por citrato de sódio não pode ser utilizado como substrato SERS em concentrações muito baixas por apresentar assinatura vibracional característica do íon citrato na mesma região do 4-HMB. No presente estudo foi mostrado que é possível a detecção de poucas moléculas de 4-HMB usando como substrato SERS o coloide de prata estabilizado por borato. A compreensão por trás deste resultado está baseada em assumir que o 4-HMB está contido na região *hot spots* na agregação controlada de AgNP em soluções aquosas utilizando 4-HMB em pH=4.

Mostramos que a adição de HCl a uma suspensão AgNP/4-HMB resultou na diminuição da intensidade da banda LSPR concomitantemente com a formação de uma nova banda plasmônica em comprimentos de onda maiores. Portanto, a agregação de AgNP foi induzida por ligações de hidrogênio associadas ao grupo terminal carboxila protonado do 4-HMB adsorvido em diferentes AgNP. Os resultados experimentais estão de acordo com a simulação

da teoria de Mie generalizada. Além disso, mostramos por DLS que há uma correlação entre a concentração de 4-HMB e os tamanhos dos agregados de AgNP formados.

Os agregados de AgNP com HCl geraram sinal SERS muito intenso de 4-HMB em contraste com pH da suspensão AgNP/4-HMB sem acidificação (pH=6). Além disso, as assinaturas vibracionais do 4-HMB não foram evidenciadas em pH acima do pK_a , como não foram observadas quando adicionou-se uma concentração equivalente de íons cloreto para induzir a agregação. Ainda, os espectros SERS do 4-BrBT que possuem estrutura similar ao 4-HMB, diferendo pelo grupo -Br, não foi observado para concentração abaixo de 1×10^{-6} mol L^{-1} em nenhuma condição estudada. Com bases nessas observações, as análises dão indícios da agregação das AgNP pela junção molecular dos grupos carboxila de 4-HMB adsorvidos em diferentes AgNP.

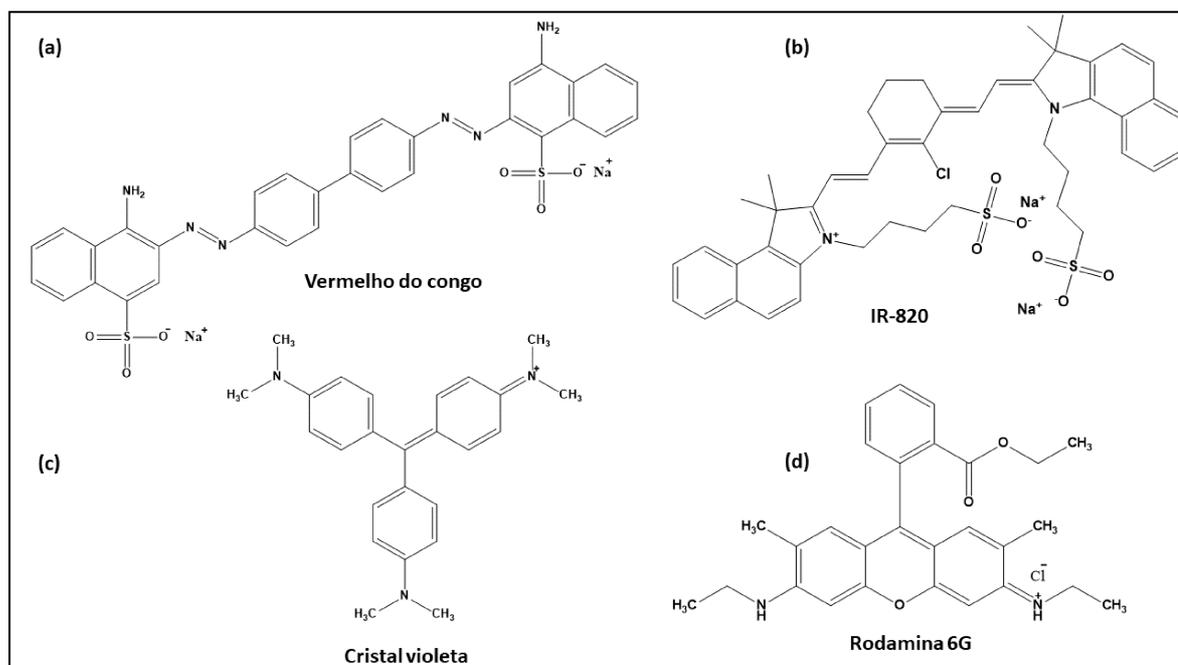
Em concentrações baixas de 4-HMB, os resultados SERS indicaram que a adsorção ocorreu tanto pelo grupo tiol quanto pelo grupo carboxila desprotonado. Além disso, foi verificada pelo aparecimento da banda 1021 e 998 cm^{-1} a presença de moléculas de tiofenol em baixa concentração; provavelmente devido à descarboxilação do grupo carboxila adsorvido na superfície do AgNP. Os resultados do SERS em concentrações baixas indicaram que havia uma mistura de moléculas adsorvidas nos *hot spots*, embora o tiofenol estivesse em concentração diminuta em relação ao 4-HMB.

Utilizando a abordagem de agregação por ligações de hidrogênio, foi demonstrada a detecção e identificação de uma única molécula para 4-HMB em solução aquosa de AgNP usando SERS não ressonante com o comprimento de onda 632,8 nm. O entendimento dos resultados do SM-SERS baseia-se na suposição de que na formação de agregados, o 4-HMB está contido na região dos *hot spots*. Os resultados experimentais estão de acordo com o observado nas simulações de TMG e são indicativos da formação de aglomerados de AgNP contendo em média seis nanopartículas. Além disso, mostramos com base na análise MCR-ALS dois perfis espectrais com mudanças na intensidade relativa entre as bandas 1588 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} . Essa variação na intensidade relativa no SERS é característica da resposta da ressonância do plásmon dos *hot spots* que podem apresentar diferentes arranjos. A abordagem apresentada é indicativa do potencial do uso deste sistema para controlar experimentalmente o tamanho dos agregados de AgNP para produzir *hot spots* mais eficientes.

4.5 OBTENÇÃO DO ESPECTRO SERS DE CORANTES NO REGIME DE UMA OU POUCAS MOLÉCULAS

Nessa seção as moléculas a serem discutidas são a rodamina 6G (R6G), cristal violeta (CV), vermelho do Congo (VC) e IR-820 cujas fórmulas estruturais são apresentadas na Figura 44. Essas moléculas apresentam seção choque Raman de alta magnitude, o que permite a observação do espectro SM-SERS com maior facilidade (KNEIPP et al., 1998; LENG; WÜRTHNER; KELLEY, 2004; LI et al., 2013). Observa-se na Figura 44 que os corantes diferem pela carga total, uma vez que os corantes IR-820 e VC apresentam carga total negativa e a R6G e CV positiva. Vale ressaltar que as AgNP utilizadas como substrato SERS apresentam uma carga superficial negativa, devido à presença de íons BO_3^- em sua superfície. Dessa forma, foi estudado se o equilíbrio de adsorção desses corantes é influenciado fortemente pelas interações eletrostáticas ou pela interação química (com os corantes atuando como base de Lewis e a superfície da AgNP atuando como ácido de Lewis).

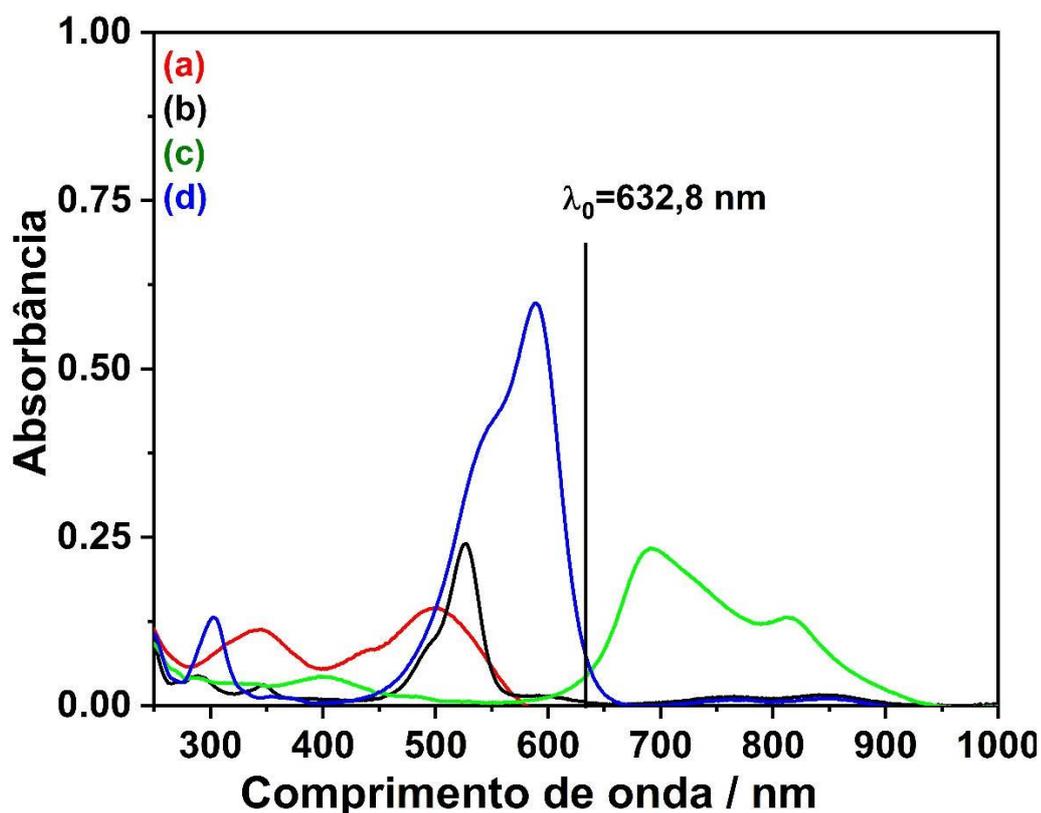
Figura 44- Fórmulas estruturais do (a) vermelho do Congo, (b) IR-820, (c) cristal violeta e (d) rodamina 6G.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Foram realizadas medidas no UV-VIS das soluções de corantes na concentração $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os espectros eletrônicos são exibidos na Figura 45, onde a linha preta indica o comprimento de onda de excitação (632,8 nm) para a obtenção dos espectros SERS. Como observado, a linha laser está fora de ressonância com transições eletrônicas das moléculas R6G e VC. Por outro lado, as moléculas CV e IR-820 apresentam bandas no espectro UV-VIS que englobam o comprimento de onda de excitação e, portanto, essas moléculas são pré-ressonantes com a linha laser em 632,8 nm. Para comparação dos espectros SERS estudaremos duas moléculas com carga total negativa e positiva dentro e fora da pré-ressonância.

Figura 45- Espectros eletrônico de solução aquosa de (a) vermelho do Congo, (b) rodamina 6G, (c) IR-820 e (d) cristal violeta em concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

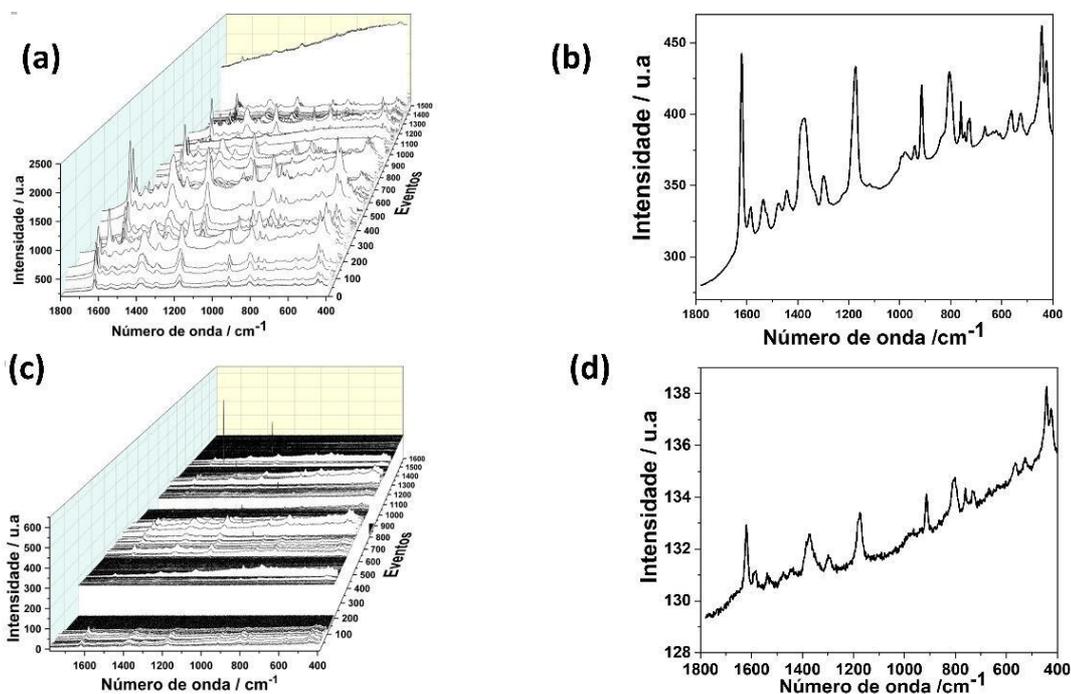


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para evitar a competição entre a adsorção da molécula e a difusão, a adição da solução de corante na suspensão de Ag foi baseada no trabalho Darby e colaboradores (2014), que propuseram a realização de uma diluição *half-half*. O preparo das amostras para a obtenção dos espectros SERS foi descrito na seção 3.6.2. Uma solução de KCl $0,12$ mol L⁻¹ foi adicionada para agregar moderadamente o coloide de Ag e levar à formação dos *hot spots*. Na concentração

usada, ocorre a agregação sem que haja o colapso da suspensão de AgNP. Nas Figura 46(a) e (b) são apresentados 1500 espectros SERS do CV obtido em um tempo de aquisição 0,1 s em concentrações $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente e nas Figura 46(c) e (d) estão representados seus espectros SERS médios. Observa-se na Figura 46(a) em todos os eventos a assinatura vibracional do CV, ocorrendo apenas oscilações na intensidade SERS (CAÑAMARES et al., 2008; DOS SANTOS; TEMPERINI; BROLO, 2016). Por outro lado, no regime de SM (Figura 46(b)) nota-se uma diminuição no sinal SERS, com intensas flutuações. Neste limite de concentração inferior, os espectros SERS são bastante ruidosos, porém, notam-se bandas características do CV em grandes partes dos espectros. O fato do CV ser pré-ressonante com a radiação incidente contribui para a observação das assinaturas vibracionais neste regime de concentração. A flutuação na intensidade é tão grande que são observados um número maior de eventos nulos e número menor de eventos não-nulos. Nos eventos não-nulos observados há uma variação grande no sinal SERS e uma alta relação sinal/ruído.

Figura 46- 1500 espectros SERS do CV obtidos no tempo de aquisição 0,1 s em concentrações de estudos (a) $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

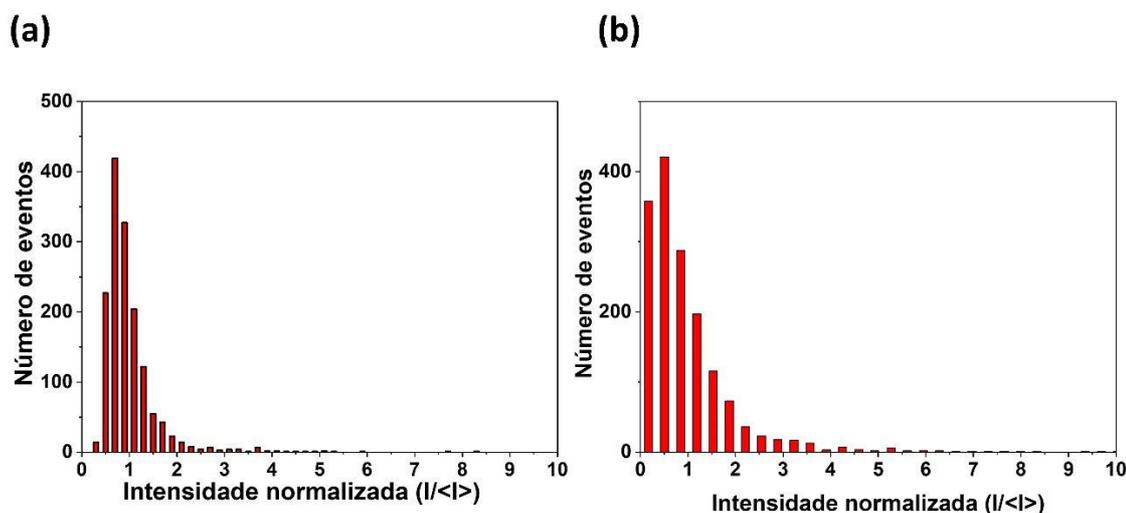
Os histogramas de distribuição de intensidade normalizada foram obtidos para as concentrações $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ pela integral da banda em 1618 cm^{-1} . Para a construção dos histogramas o *binning* (largura do intervalo de dados considerada em cada barra do histograma) foi definido usando o método de Scott (SCOTT, 1979). Este método indica que o *bin* do histograma (h) seja calculado pela Equação 24.

$$h = \frac{3,49 * DP}{N^{1/3}}$$

Equação 24

Em que DP é o desvio padrão das intensidades e N é a quantidade de espectros. O formato destes histogramas pode ser utilizado para inferência do regime de SM, na observação eventos nulos ou não nulo distribuídos na série de espectros. Utilizando este procedimento, os histogramas de intensidade normalizada foram plotados e são exibidos nas Figura 47(a) e (b). Por intensidade normalizada entende-se $I/\langle I \rangle$, ou seja, razão entre intensidade medida e a intensidade média da série de espectros. Como observado na Figura 47(a), a uma distribuição log-normal com a maioria dos eventos centrados próximo à intensidade média (intensidade normalizada=1), o que mostra uma baixa flutuação de intensidade SERS entre os espectros. Para os valores de intensidades superiores aos valores médios, a distribuição de intensidade apresenta uma calda. Estes eventos SERS são característicos de comportamento fora do regime de uma molécula. Todavia, a Figura 47(b) é caracterizada com elevado número de eventos nulos ou próximo de zero, em que segue uma distribuição exponencial, na qual a maioria dos eventos possui intensidade zero, ou muito próxima de zero, sendo raros eventos com intensidades muito maiores do que a média; porém, alguns eventos apresentam intensidades até *ca.* $9 \times$ maior que a média. A presença dos eventos nulos pode ser associada a ausência do CV na região de *hot spots*.

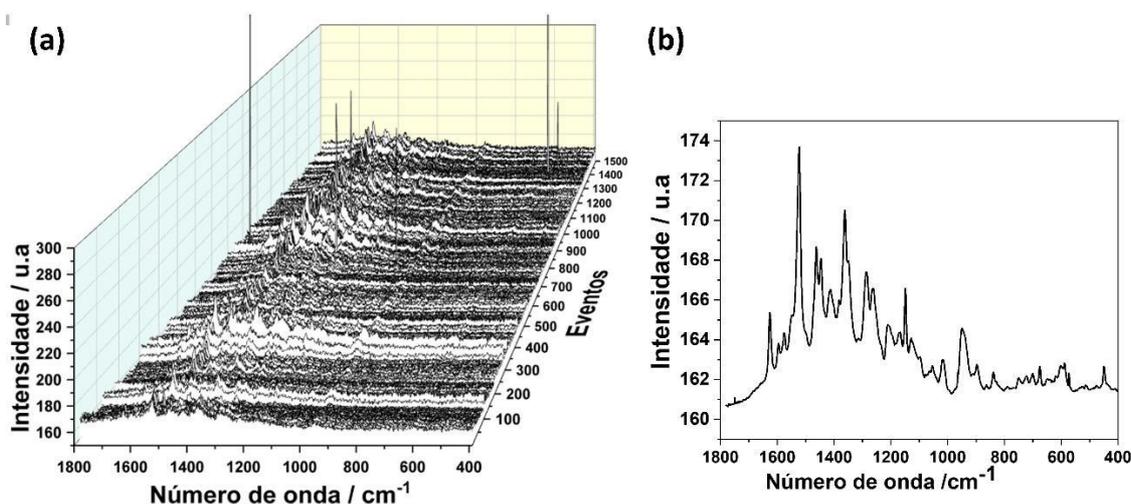
Figura 47- Histogramas da intensidade SERS normalizadas para as concentrações (a) $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e (b) $3,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O CV é pré-ressonante com o comprimento de onda 632,8 nm e possui carga total positiva, o que sugere uma atração eletrostática entre a superfície das AgNP com a molécula catiônica. Para verificar a interação da molécula com a superfície da Ag, realizamos o mesmo procedimento com IR-820, uma espécie aniônica e pré-ressonante no comprimento de onda 632,8 nm. Os espectros individuais obtidos para uma concentração final de IR-820 de $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ são apresentados na Figura 48(a) e a Figura 48(b) exibe o espectro SERS médio dos 1500 espectros. Na Figura 48(a) as bandas do IR-820 são observadas na maioria dos espectros SERS individuais. Entretanto, intensidade do sinal é muito baixa, caracterizada pela baixa relação sinal/ruído, o que se assemelha à condição de poucas moléculas na superfície. Para o IR-820 só foi possível obter os espectros SERS nessa concentração, que é bem maior do que foi obtido para o CV. Nota-se no espectro SERS médio as bandas características da molécula de IR-820 (NEVES; ANDRADE, 2015). Na mesma concentração de $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a intensidade SERS do CV (Figura 46(b)) sobressai drasticamente em relação à intensidade SERS do IR-820 (Figura 48(b)). Assim, como o CV é uma espécie catiônica e o IR-820 uma espécie aniônica, há indícios da adsorção desses corantes na superfície da Ag ocorrer por interação eletrostática, já que não foi observado sinal SERS em concentrações inferiores de IR-820.

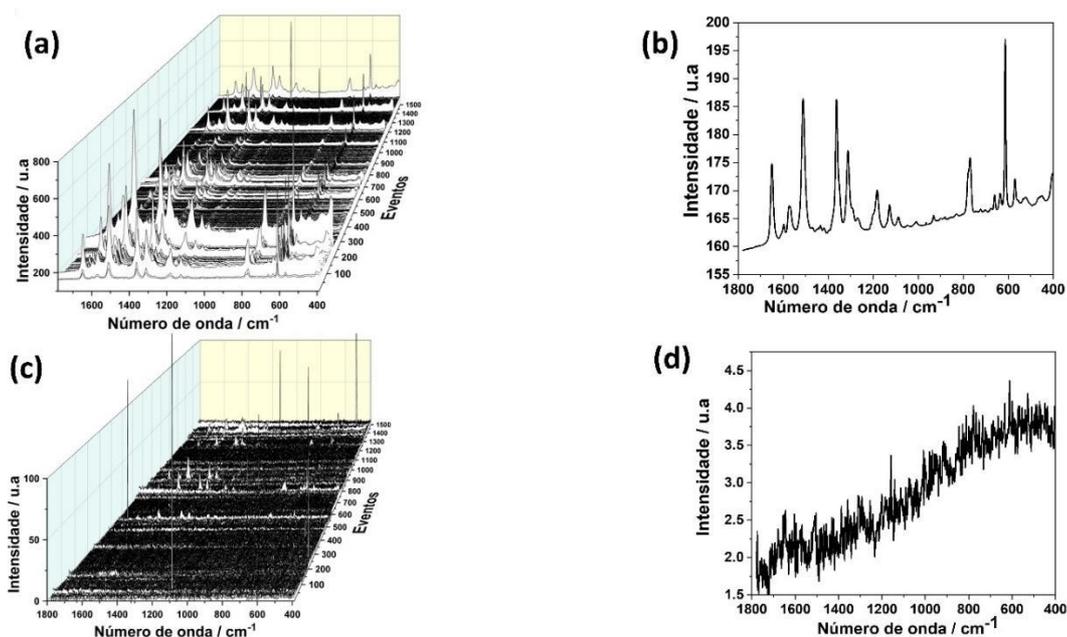
Figura 48- (a) 1500 espectros SERS obtido com tempo de aquisição 0,1 s e (b) espectro SERS médio do corante IR-820 na concentração $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As Figura 49 (a) e (c) exibem os espectros SERS da R6G (espécie catiônica) obtida na concentração $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Notam-se flutuações de intensidades, sendo mais drástica para o regime de uma única molécula em que são observados um número muito grande de eventos nulos e poucos eventos não nulos. A interação da radiação eletromagnética com a molécula, no espalhamento Raman normal apresenta seção de choque (10^{-29} cm^2) de 5 ordens de grandeza inferior quando comparado ao espalhamento Raman ressonante (10^{-24} cm^2) (AROCA, 2006). Assim, é esperado que os espectros SERS obtidos do corante R6G seja menos intenso quando comparado ao do CV, que é pré-ressonante com a radiação utilizada. Podemos dizer que o sinal SERS observado nesse regime de concentração é oriundo da adsorção do corante nos *hot spots*. Nas Figura 49 (b) e (d) são exibidos os espectros SERS médio da R6G nas concentrações de $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Na Figura 49(b) é possível observar as bandas características da R6G com baixa relação sinal/ruído (NIE; EMORY, 1997). Entretanto, no regime de SM apesar de observar eventos não nulos, o espectro SERS médio mostrado na Figura 49(d) é notado com uma baixa relação sinal/ruído e a assinatura vibracional da R6G não é observada. Devido à baixa relação sinal/ruído nos espectros SM-SERS, o sinal da molécula não-ressonante é sobreposta pelos ruído o que pode dificultar na análise de distribuição de intensidade normalizada. Dessa forma, não foram construídos os histogramas de intensidade normalizada para a inferência do SM-SERS.

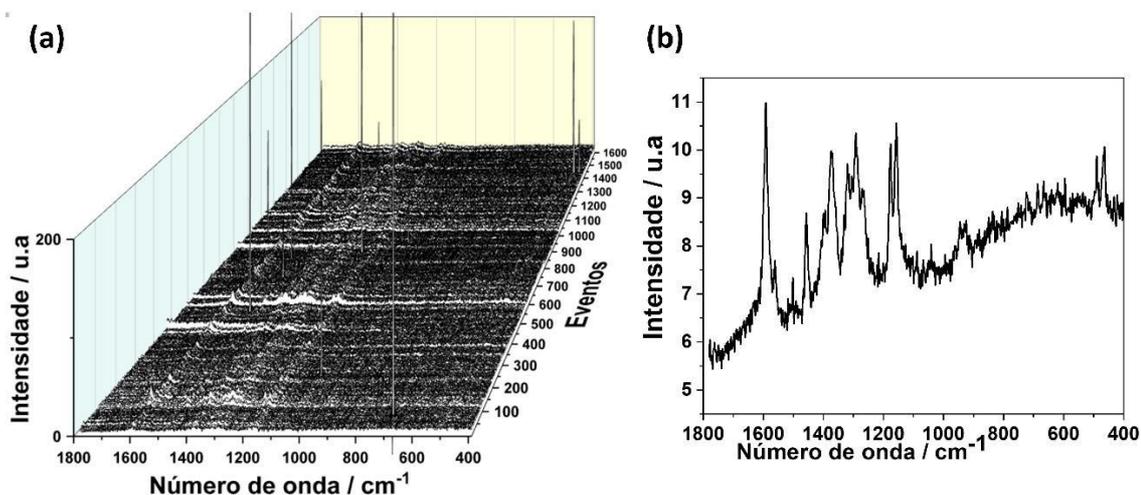
Figura 49- 1500 espectros SERS da R6G no regime de concentração (a) 3×10^{-6} mol L⁻¹ e (b) 3×10^{-9} mol L⁻¹ obtido com tempo de aquisição 0,1 segundos e (c) e (d) seus espectros SERS médio, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para verificar a preferência da interação eletrostática na obtenção do sinal SM-SERS, utilizamos para comparativo a espécie aniônica não-ressonante VC. A Figura 50 exibe o espectro SERS médio obtido do VC na concentração 3×10^{-6} mol L⁻¹. Observa-se a assinatura do espectro vibracional do VC com boa relação sinal/ruído, similar ao que já foi reportado (BEIER et al., 2007). Entretanto, para concentrações inferiores a 3×10^{-6} mol L⁻¹ não foi observado o sinal SERS do VC. Provavelmente, a dificuldade de obter o espectro SERS em baixas concentrações deve-se às repulsões eletrostáticas das espécies aniônicas pela superfície da Ag, reforçando a hipótese de que esteja ocorrendo interação eletrostática e não pela interação direta por quimissorção.

Figura 50- (a) 1500 espectro SERS individuais e (b) médio do vermelho do Congo na concentração de $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.5.1 Conclusões parciais

A obtenção de espectros SERS de corante no regime de uma única molécula para moléculas não-ressonante e pré-ressonante foi mostrada. Sendo obtido no regime de uma única molécula os espectros SERS das moléculas catiônica cristal violeta e da rodamina 6G. Não foi possível a obtenção de espectros SERS no regime de uma única molécula para as moléculas aniônicas IR-820 e vermelho no Congo. A ausência de sinal SERS nesse regime de concentração, indicam que a repulsões eletrostáticas das espécies aniônica com a superfície da Ag, ocorre por interação eletrostática.

5 CONCLUSÕES

Nesta tese foram obtidos os volumes confocais das radiações incidentes 632,8 e 785 nm no espectrômetro Raman Bruker SENTERRA. Através do volume confocal determinado, a concentração característica para a detecção de uma única molécula em diferentes configurações do espectrômetro foi obtida. A análise minuciosa do volume confocal é fundamental para obter as condições ideais do sistema a fim de trabalhar na detecção no regime de uma única molécula.

A análise de dados do cálculo teórico baseado em DFT permitiu uma atribuição satisfatória das bandas Raman para as estruturas monoméricas, diméricas do 4-HMB e dos agregados de Ag automontados pelo dímero de 4-HMB. Mostramos que o resultado da simulação tem boa concordância com o espectro experimental e sua atribuição vibracional está de acordo com a literatura. Ainda mais, verificamos bandas marcadoras para os agregados automontados por 4-HMB no modelo Ag₄, onde é possível distinguir a presença dos agregados automontados pelo modo vibracional $\nu(\text{OC})$.

A viabilidade de sintetizar AgNP estabilizadas por citrato e boroidreto de sódio é mostrada e a sua formação foi comprovada pela observação da banda LSPR nos espectros de extinção no UV-VIS. O tamanho médio das partículas das suspensões coloidais foi medido através da técnica de DLS, resultando em 83 nm e 29 nm para as AgNP estabilizadas por citrato e boroidreto de sódio, respectivamente. A utilização das AgNP estabilizadas por citrato de sódio foi descartada por apresentar assinatura vibracional do íon citrato na mesma região do 4-HMB, inviabilizando os estudos SERS em concentrações ultrabaixas.

Apresentamos uma abordagem direta para gerar *hot spots* eficientes que podem aumentar a sensibilidade do SERS para obter espectros de uma ou poucas moléculas usando o ácido 4-mercaptobenzoico. A evidência para a formação dos agregados automontados por ligações de hidrogênio associadas ao grupo terminal carboxílico protonado do 4-HMB adsorvido em diferentes AgNP foi reforçada pela espectroscopia no UV-VIS e pelas análises SERS em diferentes condições. Mostramos pela observação da banda LSPR que a adição de HCl a uma suspensão AgNP/4-HMB induziu a formação de agregados de AgNP, estando em concordância com o resultado mostrados na simulação da teoria de Mie generalizada. Ainda mais, verificamos uma dependência dos tamanhos dos agregados com a concentração de 4-HMB através das análises DLS, devido à formação das ligações de hidrogênio do grupo carboxila de diferentes 4-HMB adsorvidos em diferentes AgNP.

Na obtenção dos espectros SERS averiguou-se que os agregados de AgNP com HCl gerou sinal SERS muito intenso de 4-HMB em relação ao substrato sem acidificação do meio

(pH=6). Além disso, o sinal SERS de 4-HMB em AgNP acima do pK_a do grupo carboxila não foi observado abaixo de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em nenhuma condição. Além disso, os espectros de SERS de 4-bromobenzenotiol a $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ não apresentaram bandas atribuíveis a 4-bromobenzenotiol, reforçando a hipótese de que a intensificação de SERS para 4-HMB em baixas concentrações (abaixo de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) é devida à automontagem desencadeada por ligações de hidrogênio de AgNP abaixo do pK_a do 4-HMB.

Para o espectro SERS médio do 4-HMB em baixa cobertura superficial pôde-se perceber a presença de uma mistura de estruturas, como o 4-HMB protonado e desprotonado, além de uma pequena quantidade de benzenotiol proveniente da descarboxilação de parte das moléculas de 4-HMB. A explicação para observação dos sinais vibracionais é embasada na adsorção das estruturas nas regiões de *hot spots* induzidas pela dimerização do 4-HMB.

A detecção SERS de poucas moléculas de 4-HMB foi demonstrada experimentalmente e os resultados experimentais foram associados à condição do 4-HMB estar contido na região dos *hot spots*, sendo condizente com as simulações da teoria de Mie generalizadas. Mostramos pela análise pelo método MCR-ALS a presença de dois perfis espectrais com intensidade relativa diferentes para as bandas em 1588 cm⁻¹ e 1076 cm⁻¹. Os resultados foram interpretados em função da resposta da ressonância do plásmon nos *hot spots* com a radiação incidente 632,8 nm para diferentes arranjos de agregados de AgNP formados, o que permite a observação de flutuações de intensidade relativas.

Os espectros SERS dos corantes catiônicos cristal violeta (pré-ressonante) e da rodamina 6G (não-ressonante) foram obtidos no regime de uma única molécula. Por outro lado, o sinal SERS dos corantes aniônicos, IR-820 (pré-ressonante) e vermelho no Congo (não-ressonante) não apresentaram assinatura vibracional em concentrações inferiores $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Nessa comparação pôde-se perceber que a ausência de sinal SM-SERS para os corantes aniônicos, indicam uma interação eletrostática do corante com a superfície da Ag e não uma adsorção pela interação direta.

5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Existem alguns pontos na parte dos resultados que merecem um refinamento e algumas explicações para finalização das discussões nos estudos de SM-SERS. Entretanto, podem ser realizadas em trabalhos futuros para a complementação ou obtenção de melhores resultados. Podemos destacar:

- a) avaliar o tempo de adsorção do 4-HMB em AgNP em concentrações ultrabaixas;
- b) verificar a influência do desempenho SERS em diferentes tempos de adsorção para 4-HMB e determinar a melhor condição para a obtenção dos espectros;
- c) obter maior sequência de dados, provavelmente em torno de 4000 espectros SERS de poucas ou uma molécula, para o 4-HMB e analisar pelo método MCR-ALS;
- d) correlacionar no regime de poucas moléculas pela análise MCR-ALS os perfis espectrais obtidos em diferentes concentrações 4-HMB com o tamanho dos agregados;
- e) realizar simulações da teoria de Mie generalizada para ajudar na interpretação dos resultados experimentais dos agregados automontados com dímero de 4-HMB;
- f) modificar as AgNP com cisteamina para induzir carga superficial positiva modificando o pH e estudar a sua interação com os corantes aniônicos em regime SM-SERS;
- g) verificação da preferência da interação eletrostática.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 15, p. 5215–5217, 1 jun. 1977.
- ANDRADE, G. F. S. et al. Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering on Gold Concentric Rings: Polarization Dependence and Intensity Fluctuations. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 4, p. 2672–2676, 2 fev. 2012.
- AROCA, R. **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- BEIER, H. T. et al. Application of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Detection of Beta Amyloid Using Nanoshells. **Plasmonics**, v. 2, n. 2, p. 55–64, 6 jun. 2007.
- BLACKIE, E. et al. Bi-analyte SERS with isotopically edited dyes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 28, p. 4147, 2008.
- BLACKIE, E. J.; LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 40, p. 14466–14472, 14 out. 2009.
- CAI, W. B. et al. Investigation of surface-enhanced Raman scattering from platinum electrodes using a confocal Raman microscope: dependence of surface roughening pretreatment. **Surface Science**, v. 406, n. 1–3, p. 9–22, maio 1998.
- CAÑAMARES, M. V. et al. DFT, SERS, and single-molecule SERS of crystal violet. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 51, p. 20295–20300, 2008.
- CAO, J.; SUN, T.; GRATAN, K. T. V. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 195, p. 332–351, maio 2014.
- CASTRO, J. L. et al. Surface-enhanced Raman scattering of 3-mercaptopropionic acid adsorbed on a colloidal silver surface. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 35, n. 11, p. 997–1000, nov. 2004.
- CHARKOVA, T.; ZDANIAUSKIENĖ, A. Synthesis and comparison of gold nanoparticles coated with silicon, manganese and titanium dioxides. **Chemija**, v. 31, n. 4, p. 197–202, 19 out. 2020.
- CHUNG, T. et al. Plasmonic Nanostructures for Nano-Scale Bio-Sensing. **Sensors**, v. 11, n. 11, p. 10907–10929, 21 nov. 2011.
- CIALLA, D. et al. Investigation on the Second Part of the Electromagnetic SERS Enhancement and Resulting Fabrication Strategies of Anisotropic Plasmonic Arrays. **ChemPhysChem**, v. 11, n. 9, p. NA-NA, 16 abr. 2010.

CLARK, R. J. H.; DINES, T. J. Resonance Raman Spectroscopy, and Its Application to Inorganic Chemistry. New Analytical Methods (27). **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 2, p. 131–158, fev. 1986.

CORIO, P. et al. Contribution of the Charge Transfer Mechanism to the Surface-Enhanced Raman Scattering of the Binuclear Ion Complex $[Fe_2((Bpe)(CN)_{10})_6]$ - Adsorbed on a Silver Electrode in Different Solvents. **Langmuir**, v. 15, n. 7, p. 2500–2507, 1 mar. 1999.

CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2**, v. 75, p. 790, 1979.

CUNY, J. et al. Density-functional tight-binding approach for metal clusters, nanoparticles, surfaces and bulk: application to silver and gold. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 30, n. 30, p. 303001, 1 ago. 2018.

CUONG, N. T. Absorption of some small silver clusters: DFT and Caspt2 calculations. **Vietnam Journal of Science and Technology**, v. 55, n. 6A, p. 72, 23 abr. 2018.

DADOSH, T. et al. Plasmonic Control of the Shape of the Raman Spectrum of a Single Molecule in a Silver Nanoparticle Dimer. **ACS Nano**, v. 3, n. 7, p. 1988–1994, 28 jul. 2009.

DARBY, B. L.; LE RU, E. C. Competition between Molecular Adsorption and Diffusion: Dramatic Consequences for SERS in Colloidal Solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 31, p. 10965–10973, 6 ago. 2014.

DIERINGER, J. A. et al. A Frequency Domain Existence Proof of Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 51, p. 16249–16256, 1 dez. 2007.

DING, S.-Y. et al. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 13, p. 4042–4076, 2017.

DOS SANTOS, D. P. et al. Electrochemical Control of the Time-Dependent Intensity Fluctuations in Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 41, p. 17737–17744, 15 out. 2009.

DOS SANTOS, D. P. Statistical Analysis of Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Distributions. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 124, n. 12, p. 6811–6821, 26 mar. 2020.

DOS SANTOS, D. P.; TEMPERINI, M. L. A.; BROLO, A. G. Surface-Enhanced Raman Scattering: Principles and Applications for Single-Molecule Detection. In: **Introduction to Plasmonics**. [s.l.] Jenny Stanford Publishing, 2015. v. 5p. 295–338.

DOS SANTOS, D. P.; TEMPERINI, M. L. A.; BROLO, A. G. Single-Molecule Surface-Enhanced (Resonance) Raman Scattering (SE(R)RS) as a Probe for Metal Colloid Aggregation State. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 37, p. 20877–20885, 22 set. 2016.

DOS SANTOS, D. P.; TEMPERINI, M. L. A.; BROLO, A. G. Intensity Fluctuations in Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Scattering. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 2, p. 456–464, 19 fev. 2019.

DREUW, A.; HEAD-GORDON, M. Single-Reference ab Initio Methods for the Calculation of Excited States of Large Molecules. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 11, p. 4009–4037, 1 nov. 2005.

ETCHEGOIN, E. L. R. P. **Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy : and related plasmonic effects**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier Science, 2009.

ETCHEGOIN, P. et al. New limits in ultrasensitive trace detection by surface enhanced Raman scattering (SERS). **Chemical Physics Letters**, v. 375, n. 1–2, p. 84–90, jun. 2003.
ETCHEGOIN, P. G.; MEYER, M.; LE RU, E. C. Statistics of single molecule SERS signals: is there a Poisson distribution of intensities? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 23, p. 3006, 2007.

FAN, M.; ANDRADE, G. F. S.; BROLO, A. G. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 693, n. 1–2, p. 7–25, maio 2011.

FAN, M.; ANDRADE, G. F. S.; BROLO, A. G. A review on recent advances in the applications of surface-enhanced Raman scattering in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1097, p. 1–29, fev. 2020.

FANG, Y.; SEONG, N.-H.; DLOTT, D. D. Measurement of the Distribution of Site Enhancements in Surface-Enhanced Raman Scattering. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 388–392, 18 jul. 2008.

FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163–166, maio 1974.

FRISCH, M. J. et al. Gaussian 09. **Wallingford**, 2009.

GRASSESCHI, D.; DOS SANTOS, D. Nanomateriais plasmônicos: parte i. fundamentos da espectroscopia de nanopartículas e sua relação com o efeito SERS. **Química Nova**, v. 43, n. 10, p. 1463–1481, 2020.

HO, C.-H.; LEE, S. SERS and DFT investigation of the adsorption behavior of 4-mercaptobenzoic acid on silver colloids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 474, p. 29–35, jun. 2015.

JAMRÓZ, M. H. Vibrational Energy Distribution Analysis (VEDA): Scopes and limitations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p. 220–230, out. 2013.

JEANMAIRE, D. L.; VAN DUYN, R. P. Surface raman spectroelectrochemistry. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 84, n. 1, p. 1–20, nov. 1977.

JOHNSON, P. B.; CHRISTY, R. W. Optical Constants of the Noble Metals. **Physical Review B**, v. 6, n. 12, p. 4370–4379, 15 dez. 1972.

JUN, B.-H. et al. Surface-enhanced Raman scattering-active nanostructures and strategies for bioassays. **Nanomedicine**, v. 6, n. 8, p. 1463–1480, out. 2011.

KAMBHAMPATI, P. et al. On the chemical mechanism of surface enhanced Raman scattering: Experiment and theory. **The Journal of Chemical Physics**, v. 108, n. 12, p. 5013–5026, 22 mar. 1998.

KASHINSKI, D. O. et al. Harmonic Vibrational Frequencies: Approximate Global Scaling Factors for TPSS, M06, and M11 Functional Families Using Several Common Basis Sets. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 121, n. 11, p. 2265–2273, 23 mar. 2017.

KIEFER, W. et al. Time evolution of resonance Raman scattering from simple systems. **Journal of Molecular Structure**, v. 347, p. 229–244, mar. 1995.

KNEIPP, K. et al. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). **Physical Review Letters**, v. 78, n. 9, p. 1667–1670, 3 mar. 1997.

KNEIPP, K. et al. Single-Molecule Detection of a Cyanine Dye in Silver Colloidal Solution Using Near-Infrared Surface-Enhanced Raman Scattering. **Applied Spectroscopy**, v. 52, n. 2, p. 175–178, fev. 1998.

KNEIPP, K. et al. Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 14, n. 18, p. 202, 13 maio 2002.

LE RU, E. C. et al. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 37, p. 13794–13803, 1 set. 2007.

LE RU, E. C. et al. Experimental Verification of the SERS Electromagnetic Model beyond the $|E|^4$ Approximation: Polarization Effects. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 22, p. 8117–8121, 1 jun. 2008.

LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. Rigorous justification of the $|E|^4$ enhancement factor in Surface Enhanced Raman Spectroscopy. **Chemical Physics Letters**, v. 423, n. 1–3, p. 63–66, maio 2006.

LE RU, E. C.; MEYER, M.; ETCHEGOIN, P. G. Proof of Single-Molecule Sensitivity in Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) by Means of a Two-Analyte Technique. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 4, p. 1944–1948, 1 fev. 2006.

LE RU, E.; ETCHEGOIN, P. **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy**. [s.l.] Elsevier, 2009.

LEE, A. et al. Probing Dynamic Generation of Hot-Spots in Self-Assembled Chains of Gold Nanorods by Surface-Enhanced Raman Scattering. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 19, p. 7563–7570, 18 maio 2011.

- LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785–789, 15 jan. 1988.
- LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391–3395, 1982.
- LENG, W.; WÜRTHNER, F.; KELLEY, A. M. Resonance Raman intensity analysis of merocyanine dimers in solution. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 29, p. 10284–10294, 2004.
- LI, C. et al. Towards practical and sustainable SERS: a review of recent developments in the construction of multifunctional enhancing substrates. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 9, n. 35, p. 11517–11552, 2021.
- LI, J. F. et al. Surface analysis using shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. **Nature Protocols**, v. 8, n. 1, p. 52–65, 2013.
- LONG, D. A. **The Raman Effect**. [s.l.] Wiley, 2002. v. 8
- MAIER, S. A. **Fundamentals and Applications Plasmonics : Fundamentals and Applications**. [s.l: s.n.]. v. 677
- MARÇO, P. H. et al. Multivariate curve resolution with alternating least squares: description, operation and applications. **Química Nova**, v. 37, p. 1525–1532, 2014.
- MARQUES, F. C. et al. Characterization of 11-mercaptoundecanoic and 3-mercaptopropionic acids adsorbed on silver by surface-enhanced Raman scattering. **Vibrational Spectroscopy**, v. 98, p. 139–144, 1 set. 2018.
- MICHAELS, A. M.; JIANG, J.; BRUS, L. Ag Nanocrystal Junctions as the Site for Surface-Enhanced Raman Scattering of Single Rhodamine 6G Molecules. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 50, p. 11965–11971, 2000.
- MICHOTA, A.; BUKOWSKA, J. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 34, n. 1, p. 21–25, 2003.
- MILLOTTI, G. et al. Chitosan-4-mercaptobenzoic acid: synthesis and characterization of a novel thiolated chitosan. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 12, p. 2432, 2010.
- MOSKOVITS, M. et al. SERS and the Single Molecule. **Optical Properties of Nanostructured Random Media**, v. 227, p. 215–227, 2007.
- NEVES, T. B. V.; ANDRADE, G. F. S. SERS Characterization of the Indocyanine-Type Dye IR-820 on Gold and Silver Nanoparticles in the Near Infrared. **Journal of Spectroscopy**, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- NIE, S.; EMORY, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. **Science**, v. 275, n. 5303, p. 1102–1106, 21 fev. 1997.

- OLIVEIRA, L. F. L. et al. Benchmarking Density Functional Based Tight-Binding for Silver and Gold Materials: From Small Clusters to Bulk. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 120, n. 42, p. 8469–8483, 27 out. 2016.
- PANDOLI, O. G. et al. Ultra-highly conductive hollow channels guided by a bamboo bio-template for electric and electrochemical devices. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 8, n. 7, p. 4030–4039, 2020.
- PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, nov. 2011.
- PHAN, H. T.; HAES, A. J. Impacts of pH and Intermolecular Interactions on Surface-Enhanced Raman Scattering Chemical Enhancements. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 26, p. 14846–14856, 2018.
- PILOT et al. A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering. **Biosensors**, v. 9, n. 2, p. 57, 17 abr. 2019.
- PIRONON, J. et al. Fluid inclusions as micro-samplers in batch experiments: A study of the system C-O-H-S-cement for the potential geological storage of industrial acid gas. **Chemical Geology**, v. 237, n. 3–4, p. 264–273, 2007.
- RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new class of spectra due to secondary radiation. **Indian Journal of Physics**, v. 2, p. 399–419, 1928.
- RINGLER, M. et al. Shaping Emission Spectra of Fluorescent Molecules with Single Plasmonic Nanoresonators. **Physical Review Letters**, v. 100, n. 20, p. 203002, 22 maio 2008.
- RODRIGUES-OLIVEIRA, A. F. et al. Evaluation of Common Theoretical Methods for Predicting Infrared Multiphotonic Dissociation Vibrational Spectra of Intramolecular Hydrogen-Bonded Ions. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 9075–9085, 31 ago. 2018.
- RODRIGUES, D. C.; ANDRADE, G. F. S.; TEMPERINI, M. L. A. SERS performance of gold nanotubes obtained by sputtering onto polycarbonate track-etched membranes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 4, p. 1169–1176, 2013.
- RODRIGUES, J. A. R. Ligações hidrogênio fortes em ácidos dicarboxílicos e diaminas aromáticas. **QUÍMICA NOVA**, v. 23, n. 6, p. 812–817, 2000.
- ROZENFELD, J. H. K. **Arranjos supramoleculares de oligodeoxinucleotídeos e fragmentos de bicamada catiônica : preparação , caracterização e atividade imunoadjuvante.** [s.l.] instituto de química, USP, São Paulo, 2011.
- RUIZ PESTANA, L. et al. Ab initio molecular dynamics simulations of liquid water using high quality meta-GGA functionals. **Chemical Science**, v. 8, n. 5, p. 3554–3565, 2017.
- SALA, O. **Sala - Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho.** 2ª edição ed. [s.l: s.n.].
- SANTINOM, A. et al. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) as probe of plasmonic near-field resonances. **Vibrational Spectroscopy**, v. 99, n. April, p. 34–43, 2018.

SANTOS, D. P. DOS; TEMPERINI, M. L. A.; BROLO, A. G. Single-Molecule Surface-Enhanced (Resonance) Raman Scattering (SE (R) RS) as a Probe for Metal Colloids Aggregation State. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, 2016.

SCOTT, D. W. On optimal and data-based histograms. **Biometrika**, v. 66, n. 3, p. 605–610, 1979.

SETHI, M.; JOUNG, G.; KNECHT, M. R. Linear Assembly of Au Nanorods Using Biomimetic Ligands. **Langmuir**, v. 25, n. 3, p. 1572–1581, 3 fev. 2009.

SHARAABI, Y.; SHEGAI, T.; HARAN, G. Two-state analysis of single-molecule Raman spectra of crystal violet. **Chemical Physics**, v. 318, n. 1–2, p. 44–49, 2005.

SHEGAI, T. O.; HARAN, G. Probing the Raman scattering tensors of individual molecules. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 6, p. 2459–2461, 2006.

SUDEEP, P. K.; JOSEPH, S. T. S.; THOMAS, K. G. Selective Detection of Cysteine and Glutathione Using Gold Nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 18, p. 6516–6517, 1 maio 2005.

SUN, Z. et al. pH-Controlled Reversible Assembly and Disassembly of Gold Nanorods. **Small**, v. 4, n. 9, p. 1287–1292, set. 2008.

SZUNERITS, S.; SPADAVECCHIA, J.; BOUKHERROUB, R. Surface plasmon resonance: Signal amplification using colloidal gold nanoparticles for enhanced sensitivity. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 153–164, 2014.

TAWADA, Y. et al. A long-range-corrected time-dependent density functional theory. **Journal of Chemical Physics**, v. 120, n. 18, p. 8425–8433, 2004.

VILLA, J. E. L. et al. Colloidal gold clusters formation and chemometrics for direct SERS determination of bioanalytes in complex media. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 224, p. 117380, jan. 2020.

WANG, Y.; GONG, X. G. First-principles study of neutral and charged silver clusters. **European Physical Journal D**, v. 34, n. 1–3, p. 19–22, 2005.

WANG, Z. et al. The structural basis for giant enhancement enabling single-molecule Raman scattering. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8638–8643, 22 jul. 2003.

WEI, H. et al. Highly stable SERS pH nanoprobe produced by co-solvent controlled AuNP aggregation. **Analyst**, v. 141, n. 17, p. 5159–5169, 2016.

WEI, H.; XU, H. Hot spots in different metal nanostructures for plasmon-enhanced Raman spectroscopy. **Nanoscale**, v. 5, n. 22, p. 10794–10805, 2013.

WEISS, A.; HARAN, G. Time-Dependent Single-Molecule Raman Scattering as a Probe of Surface Dynamics. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 49, p. 12348–12354, dez. 2001.

WONG, M. W. Vibrational frequency prediction using density functional theory. **Chemical Physics Letters**, v. 256, n. 4–5, p. 391–399, jul. 1996.

XU, L. J. et al. Label-free detection of native proteins by surface-enhanced Raman spectroscopy using iodide-modified nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 4, p. 2238–2245, 2014.

XU, L. J. et al. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy detection of DNA with single-base sensitivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 15, p. 5149–5154, 2015.

XU, Y. Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres. **Applied Optics**, v. 34, n. 21, p. 4573, 20 jul. 1995.

ZHANG, N. et al. Large-Scale Sub-1-nm Random Gaps Approaching the Quantum Upper Limit for Quantitative Chemical Sensing. **Advanced Optical Materials**, v. 8, n. 24, p. 2001634, 27 dez. 2020.

ZHANG, S. et al. Nanonecklaces assembled from gold rods, spheres, and bipyramids. **Chemical Communications**, n. 18, p. 1816, 2007.

ZHANG, X. et al. Plasmonic photocatalysis. **Reports on Progress in Physics**, v. 76, n. 4, p. 046401, 1 abr. 2013.

ZHU, S. et al. Surface-enhanced Raman scattering of 4-mercaptobenzoic acid and hemoglobin adsorbed on self-assembled Ag monolayer films with different shapes. **Applied Physics A**, v. 117, n. 3, p. 1075–1083, 11 nov. 2014.

ZRIMSEK, A. B. et al. Single-Molecule Chemistry with Surface- and Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 11, p. 7583–7613, 14 jun. 2017.

ANEXO A - Coordenadas atômica das estruturas otimizadas.

Tabela 7- Coordenadas atômica da estrutura Ag₂.

	X	Y	Z
Ag₁	0.0000000	0.0000000	1.3054090
Ag₂	0.0000000	0.0000000	-1.3054090

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 8- Coordenadas atômica da estrutura Ag₄.

	X	Y	Z
Ag₁	0.0000940	-1.3437400	0.0000360
Ag₂	0.0000770	1.3440300	0.0000320
Ag₃	-2.4820830	-0.0001490	-0.0000330
Ag₄	2.4819120	-0.0001410	-0.0000360

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 9- Coordenadas atômica da estrutura Ag₆.

	X	Y	Z
Ag₁	0.3008110	-2.4601280	-0.2052160
Ag₂	-2.2513810	-1.0458120	-0.2027860
Ag₃	2.4340270	-0.4771290	-0.2033510
Ag₄	-1.6885790	1.8159950	-0.2048350
Ag₅	1.2054960	2.1678270	-0.2035280
Ag₆	-0.0003750	-0.0007520	1.0197150

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 10- Coordenadas atômica da estrutura Ag₈.

	X	Y	Z
Ag₁	2.1755240	-0.0732640	1.4861900
Ag₂	0.5896850	-1.8914550	-0.0814370
Ag₃	0.5951620	1.8920500	0.0814880
Ag₄	-2.1812710	-1.4831720	-0.0710530
Ag₅	-2.1755030	1.4876070	0.0672650
Ag₆	-0.5939430	-0.0803930	1.8890570
Ag₇	2.1800600	0.0684780	-1.4833720
Ag₈	-0.5897140	0.0801490	-1.8881390

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 11- Coordenadas atômica da estrutura Ag₁₀.

	X	Y	Z
Ag₁	0.0295590	-2.4634040	1.0790910
Ag₂	-0.9595980	-1.1420000	-1.2891440
Ag₃	1.4375540	0.0372890	1.4469590
Ag₄	-1.8283370	1.5363260	-1.0033980
Ag₅	-0.0296080	2.4635180	1.0789400
Ag₆	-1.4375580	-0.0371470	1.4470010
Ag₇	1.8282360	-1.5364010	-1.0033920
Ag₈	0.9595950	1.1419760	-1.2892360
Ag₉	-3.6947490	-0.4689610	-0.2334270
Ag₁₀	3.6949060	0.4688040	-0.2334270

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 12- Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag₂-4-HMB.

	X	Y	Z
Ag₁	1.7356420	0.8856640	-0.0000860
C₂	-1.6686740	1.2572770	0.0001020
C₃	-1.5568630	-0.1450280	0.0001720
C₄	-2.6799300	-0.9569830	0.0001230
C₅	-3.9620680	-0.3960500	-0.0000110
C₆	-4.0883750	0.9979970	-0.0001060
C₇	-2.9657560	1.8078050	-0.0000430
H₈	-0.5709360	-0.5995670	0.0002600
H₉	-2.5625280	-2.0347300	0.0001880
H₁₀	-2.5625280	1.4388330	-0.0002170
H₁₁	-3.0831130	2.8866070	-0.0001120
C₁₂	-5.1795210	-1.2240990	-0.0000540
O₁₃	-6.3211700	-0.7925060	-0.0003000
O₁₄	-4.9350240	-2.5485750	0.0002030
H₁₅	-5.7898170	-3.0092040	0.0001300
S₁₆	-0.2771320	2.3392810	0.0002170
Ag₁₇	3.4596090	-1.2564580	0.0000000

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 13- Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag₄-4-HMB.

	X	Y	Z
Ag₁	-1.3381840	1.1499580	-0.0000570
Ag₂	-2.7324440	-1.1329560	-0.0002370
Ag₃	0.0802150	-1.2624640	0.0000670
Ag₄	-4.1570870	1.2881000	0.0001490
C₅	3.5591860	-1.2269990	0.0001160
C₆	3.2814640	0.1530900	0.0001730
C₇	4.2992550	1.0934810	0.0001110
C₈	5.6398400	0.6903780	-0.0000160
C₉	5.9313490	-0.6790060	-0.0000270
C₁₀	4.9137270	-1.6169370	0.0000160
H₁₁	2.2482460	0.4861710	0.0002330
H₁₂	4.0537240	2.1495230	0.0001300
H₁₃	6.9680260	-0.9986770	-0.0001360
H₁₄	5.1591210	-2.6739920	-0.0000380
C₁₅	6.7497670	1.6567980	-0.0001080
O₁₆	7.9351040	1.3644710	-0.0002570
O₁₇	6.3500330	2.9433340	-0.0000220
H₁₈	7.1444130	3.5017200	-0.0000980
S₁₉	2.3018960	-2.4597510	0.0002640

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 14- Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag₆-4-HMB.

	X	Y	Z
C₁	3.2130090	-1.4801570	-0.5093770
C₂	4.4118000	-2.1790510	-0.7553050
C₃	5.6431130	-1.6372130	-0.4269290
C₄	5.7257430	-0.3697690	0.1644920
C₅	4.5426350	0.3340740	0.4153720
C₆	3.3117510	-0.2089400	0.0865850
H₇	4.3655630	-3.1621970	-1.2126120
H₈	6.5485220	-2.1983880	-0.6288390
H₉	4.5991040	1.3160890	0.8734110
H₁₀	2.4051450	0.3519730	0.2915030
C₁₁	7.0123490	0.2433950	0.5301330
O₁₂	7.1458010	1.3416550	1.0467590
O₁₃	8.0816810	-0.5244350	0.2430720
H₁₄	8.8772880	-0.0399170	0.5169960
S₁₅	1.6784080	-2.2278060	-0.9413340
Ag₁₆	-0.4010020	1.6675970	1.2790870
Ag₁₇	-1.9481680	-0.6941050	1.8454440
Ag₁₈	-0.1780090	2.1359150	-1.4484750
Ag₁₉	-2.8282970	-1.9319970	-0.4790440
Ag₂₀	-0.2041880	-0.6501510	-0.4678900
Ag₂₁	-2.4963440	0.8477530	-0.5616240

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 15- Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag₈-4-HMB.

	X	Y	Z
C₁	4.3288000	-1.4303060	-0.5211310
C₂	4.0061530	-0.0807070	-0.2812520
C₃	4.9885610	0.8937090	-0.2084080
C₄	6.3378430	0.5581830	-0.3739570
C₅	6.6738560	-0.7796450	-0.6148260
C₆	5.6915280	-1.7517620	-0.6879170
H₇	2.9657450	0.2012090	-0.1515730
H₈	4.7080620	1.9244550	-0.0219000
H₉	7.7172890	-1.0471760	-0.7441130
H₁₀	5.9713720	-2.7835650	-0.8744590
C₁₁	7.4107280	1.5621970	-0.3022990
O₁₂	8.6016340	1.3289380	-0.4376240
O₁₃	6.9699640	2.8135450	-0.0663910
H₁₄	7.7434170	3.3997980	-0.0368210
S₁₅	3.1159860	-2.7023910	-0.6230800
Ag₁₆	0.8415000	-1.6861280	-0.0658780
Ag₁₇	0.1908830	0.6137350	1.6003800
Ag₁₈	-1.9465420	-1.6533650	-0.9149440
Ag₁₉	-0.9748200	2.9194780	0.5646630
Ag₂₀	-3.1927650	0.6241970	-1.9397030
Ag₂₁	-0.4610850	0.7444550	-1.1725690
Ag₂₂	-1.2756570	-1.8180060	1.8362070
Ag₂₃	-2.5466040	0.5657130	0.8103340

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 16- Coordenadas atômica da estrutura do complexo modelo Ag₁₀-4-HMB.

	X	Y	Z
Ag₁	1.4509850	-2.2980250	1.3461330
Ag₂	0.3995350	-1.2812870	-1.1513700
Ag₃	2.6020450	0.3117420	1.4410420
Ag₄	-0.7615020	1.2767370	-1.1081850
Ag₅	0.9476300	2.5615110	0.9321870
Ag₆	-0.1807350	-0.0062450	1.3472430
Ag₇	3.1931030	-1.4239290	-0.8058260
Ag₈	2.0740330	1.1377520	-1.2766760
Ag₉	-2.3318880	-0.9563250	-0.3425090
Ag₁₀	4.7662070	0.8688410	-0.3760670
C₁₁	-5.8490240	-1.1944460	-0.1372730
C₁₂	-5.6900480	0.2013650	-0.0413990
C₁₃	-6.7836080	1.0459490	0.0636860
C₁₄	-8.0841840	0.5272630	0.0789260
C₁₅	-8.2576130	-0.8591910	-0.0118870
C₁₆	-7.1646090	-1.7011090	-0.1174510
H₁₇	-4.6891040	0.6213260	-0.0510740
H₁₈	-6.6297850	2.1168970	0.1343610
H₁₉	-9.2624700	-1.2679030	0.0010080
H₂₀	-7.3180350	-2.7730970	-0.1878460
C₂₁	-9.2716760	1.3890710	0.1872740
O₂₂	-10.4268610	0.9939290	0.2051840
O₂₃	-8.9849560	2.7030750	0.2686030
H₂₄	-9.8244520	3.1862250	0.3363940
S₂₅	-4.4918370	-2.3049460	-0.2771910

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

ANEXO B - Apresentação em congressos

Trabalhos apresentados em congresso:

MARQUES, Flávia Campos; ANDRADE, Gustavo Fernandes Sousa.; “Espectro SERS no regime de uma e poucas moléculas do ácido 4-mercaptobenzoico em AgNP viabilizado por hot spots gerados ligação de hidrogênio”. Pôster apresentado no 1º Fronteiras da Nanociência e Nanotecnologia: Avanços realizados por jovens cientistas brasileiros, realizado de 27 a 29 de outubro de 2021. Congresso virtual organizado pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

MARQUES, Flávia Campos; ANDRADE, Gustavo Fernandes Sousa.; “Seletividade SERS em substrato de AgNP para detecção de corantes catiônicos no regime de uma molécula”. Pôster apresentado no Twitter #LatinXChem, realizado de 20 a 24 de setembro de 2021.

MARQUES, Flávia Campos; OLIVEIRA, Débora Guimarães; ANDRADE, Gustavo Fernandes Sousa.; “Experimental factors that influence in the yield and reproducibility of gold nanorods synthesis and SERS spectroscopy performance”. Pôster apresentado 43ª Reunião Anual Virtual da SBQ, realizado nos dias 5 a 16 de outubro de 2020.

MARQUES, Flávia Campos; ALVES, Raisa Siqueira; DOS SANTOS, Diego Pereira; ANDRADE, Gustavo Fernandes Sousa. “SM-SERS spectra of 4-mercaptobenzoic on H-bonds induced hot spots in acidic médium”. Pôster apresentado no VII Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, realizado de 5 a 8 de dezembro de 2022.

ANEXO C - Artigos e capítulos de livros publicados

Durante o período de construção da tese, esses trabalhos foram publicados, não tendo necessariamente relação com o presente trabalho de doutorado:

MARQUES, FLÁVIA CAMPOS; ALVES, RAISA SIQUEIRA; PEREIRA DOS SANTOS, DIEGO; ANDRADE, GUSTAVO FERNANDES SOUZA. Surface-enhanced Raman spectroscopy of one and a few molecules of acid 4- mercaptobenzoic in AgNP enabled by hot spots generated by hydrogen bonding. PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS, 2022. (artigo baseado em resultados dessa tese)

ANDRADE, GUSTAVO F. S.; OLIVEIRA, R.; **MARQUES, FLÁVIA C.**; MARTINI, W. S.; OLIVEIRA, GABRIELA P.; SANTANA, A. C.; TOLEDO, P. H. M.. Surface-Enhanced Raman Scattering Sensing of Food Contaminants. In: Roger Narayan. (Org.). Encyclopedia of Sensors and Biosensors. 1ed.Amsterdam: Elsevier, 2022, v. 6, p. 1-13.

MARQUES, FLÁVIA C.; AZEVEDO, GUSTAVO C.; SENNA, CARLOS A.; ARCHANJO, BRÁULIO S.; CORRÊA, CHARLANE C.; MATOS, RENATO C.; PEREIRA DOS SANTOS, DIEGO; F. S. ANDRADE, GUSTAVO. Structural characterization and plasmonic properties of manganese oxide-coated gold nanorods. SPECTROCHIMICA ACTA PART A-MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY, v. 272, p. 120988, 2022.

PACHECO, TIAGO S.; LUDWIG, ZÉLIA M.C.; ULLAH, SAIF; DE MENDONÇA, JOÃO P.A. ; SATO, FERNANDO ; DE SOUZA, RAFAEL L. ; PAIVA, EDINEI C. ; MARTINS, MAXIMILIANO D. ; **MARQUES, FLAVIA C.** ; ANDRADE, GUSTAVO F.S. ; GHOSH, SANTUNU . Magnetic characterization, electronic structure and vibrational properties of $(\text{NH}_4)_2 \text{M}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M=Mn, Ni) crystals. SOLID STATE COMMUNICATIONS, v. 334-335, p. 114384, 2021.