



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de Substrato para Uso com Efeito Raman Intensificado por Superfície (SERS
– *Surface-Enhanced Raman Scattering*) e Aplicações para Compostos Modelo**

Karolyne Vilela de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Joel Camargo Rubim

Brasília – DF
Dezembro de 2015

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de Substrato para Uso com Efeito Raman Intensificado por Superfície (SERS
– *Surface-Enhanced Raman Scattering*) e Aplicações para Compostos Modelo**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Karolyne Vilela de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Joel Camargo Rubim

**Brasília – DF
Dezembro de 2015**

COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado da aluna **Karolyne Vilela de Oliveira**, intitulada “**Desenvolvimento de Substrato com Uso para Efeito Raman Intensificado por Superfície (SERS – *Surface-Enhanced Raman Scattering*) e Aplicações para Compostos Modelo**”, apresentada no Instituto de Química da Universidade de Brasília em 02 de dezembro de 2015.

Prof. Dr. Joel Camargo Rubim
Presidente (IQ – UnB)

Prof. Dr. Sebastião William da Silva
Membro Titular (IF – UnB)

Prof. Dr. Alexandre Fonseca
Membro Titular (IQ – UnB)

Brasília, 02 de dezembro de 2015.

*À minha família,
Cujo apoio foi essencial durante todos os momentos da minha vida.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo dom da aprendizagem e por acalmar meu coração nos momentos de desespero e dificuldade;

Ao Professor Dr. Joel C. Rubim, pela orientação, ensinamentos, conselhos e, principalmente, pela paciência, apoio e compreensão durante os momentos difíceis que vivenciei;

A minha família, Eunice (mãe), Odailson (pai), Thiago (irmão) e Anna Carolinne (cunhada), que são os pilares da minha vida e sempre me apoiaram e incentivaram a traçar os caminhos do bem e do sucesso. Em especial à minha mãe por entender e me tranquilizar nos momentos mais difíceis que passei e, principalmente, por orar sempre por mim;

A minha avó Zenilde, minha segunda mãe e minha base, pelo amor, dedicação, apoio, orgulho e incentivo dados a mim em todos os momentos da minha vida;

A minha avó Lucia de Paula (*in memoriam*), pelo orgulho e por ter me proporcionado momentos felizes e ter me aproximado da família paterna;

Aos meus queridos “químifriends” Elder, Gabriel, Thayana, Idio, Ana Cândida, Cristiane, Gabriela e Fernanda, pelo apoio, amizade, momentos de descontração e por serem os melhores amigos que uma pessoa pode ter;

Aos meus melhores amigos, Rafaela, Espedito, Felipe e Jefferson, por sempre estarem ao meu lado, pelos momentos divertidos e pelas palavras de conforto nos momentos necessários;

A todos os meus professores de graduação, em especial, Luiz, Silvia, Jonatas, Vanda e Sérgio, por participarem da minha formação e acreditarem no meu potencial;

Aos colegas de laboratório: Fernando, Renato, Marcelo, Yuri, David, Beatriz e, em especial, Anderson, Vianney e Isabela, cuja grande ajuda foi essencial e sem a qual a realização desse trabalho seria muito mais difícil;

A técnica do Laboratório de Microscopia (IB-UnB) Ingrid, pela realização das análises microscópicas;

A Lidiane, pelo carinho, amizade, apoio e dedicação a mim concedidos durante estes 6 árduos anos de formação acadêmica;

À Capes, pela bolsa a mim concedida.

Resumo

Neste trabalho foram preparados dois substratos com atividade SERS (*surface-enhanced Raman scattering*), baseados na dispersão de nanopartículas de prata em solução aquosa (AgNPs/Coloide) e em gel de agarose (AgNPs/Agar). Esses substratos foram caracterizados por MET e espectroscopia UV-vis. Ambos os substratos foram também investigados pelo efeito SERS, registrando-se 100 espectros em triplicata empregando o modo de mapeamento Raman numa região de 20x20 μm . Os diâmetros médios das AgNPs nas amostras de AgNPs/Coloide e AgNPs/Agar foram de 8 nm e 19 nm, respectivamente. Os espectros UV-vis desses materiais revelam que as AgNPs/Agar apresentam ressonâncias de plasmon de superfície na região de 600 nm. A adsorção da rodamina 6G (R6G) foi investigada para ambos os substratos, para concentrações entre 10^{-8} M e 10^{-5} M, por excitação SERS em 632,8 nm. As intensidades SERS da R6G nas AgNPs/Agar foram ca. 10 vezes mais fortes que aquelas apresentadas para a R6G adsorvida nas AgNPs/Coloide. As isotermas de adsorção obtidas para ambos os substratos foram bem ajustadas a isotermas de Langmuir com constantes de adsorção e energias livres de Gibbs de adsorção semelhantes, características de adsorção química. As AgNPs/Agar também foram investigadas como um substrato SERS-ativo para a adsorção de azul de metileno (MB), cristal violeta (CV) e benzotriazolato (BTA). Os resultados SERRS para o MB mostraram sinais de monômeros e dímeros de MB. Os resultados também mostraram que R6G e CV adsorvem na superfície das AgNPs/Agar formando pares iônicos com os íons cloreto adsorvidos usados para promover agregação, enquanto que o MB e BTA adsorvem quimicamente na superfície das AgNPs formando ligações Ag-N. Curvas de intensidade SERS vs. concentração do adsorbato em solução foram usadas para obter isotermas de adsorção. Em todos os sistemas investigados os dados experimentais apresentaram razoável ajuste para isotermas de Langmuir com constante de adsorção e energia livre de Gibbs de adsorção compatível com adsorção química ($< -30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Os resultados (SERS/SERRS) para R6G, MB e CV, em concentração de 10^{-8} M, adsorvidos em AgNPs/Agar mostraram que os sinais SERS/SERRS de moléculas únicas desses adsorbatos foram observados, mostrando que o material AgNPs/Agar obtido é um substrato adequado para a investigação SERS de adsorbatos em concentrações muito baixas.

Palavras-chave: SERS, nanopartículas de prata, agarose, isotermas de adsorção.

Abstract

Two different SERS (surface-enhanced Raman scattering) substrates have been prepared based on silver nanoparticles (AgNPs) dispersed in water solution (AgNPs/Colloid) and in agarose gel (AgNPs/Agar). The materials were characterized by TEM and UV-vis spectroscopy. Both substrates were also investigated by SERS by recording 100 spectra in triplicates, using the Raman mapping procedure in an area of 20x20 μm . The mean diameters of the AgNPs in these substrates were 8 nm and 19 nm, respectively. The UV-vis spectra of these materials show that the AgNPs/Agar present AgNPs aggregates with surface plasmon resonances in the region of 600 nm. The adsorption of Rhodamine 6G (R6G) at concentrations ranging from 10^{-8} M to 10^{-5} M on both substrates was investigated by SERS excitation at 632.8 nm. The SERS intensities of R6G on the AgNPs/Agar were ca. 10 times stronger than those displayed for R6G adsorbed on the AgNPs/Colloid. Adsorption isotherms obtained for both substrates were well fitted to Langmuir isotherms with similar adsorption constants and free Gibbs adsorption energy, characteristic of chemical adsorption. The AgNPs/Agar was further investigated as a SERS-active substrate for the adsorption of Methylene Blue (MB), Crystal Violet (CV) and benzotriazolate (BTA). The SERRS results for MB have shown signals from MB monomers and dimers. The results have also shown that R6G and CV adsorb on the AgNPs/Agar surface forming ion-pairs with the adsorbed chloride ions used to promote the AgNPs aggregation, while MB and BTA adsorb chemically on the AgNPs surface forming Ag-N bonds. Curves of SERS intensity vs adsorbate concentration in solution were used to obtain adsorption isotherms. In all investigated systems the experimental data presented reasonable fitting to Langmuir isotherm with adsorption constants and free Gibbs adsorption energy compatible with chemical adsorption (< -30 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). The results (SERS/SERRS) for R6G, MB and CV at 10^{-8} M concentration adsorbed on AgNPs/Agar have shown that SERS/SERRS signals from single molecules of these adsorbates were observed, showing that the AgNPs/Agar material obtained is a suitable substrate for SERS investigation of adsorbates at very low concentrations.

Key-words: *SERS, silver nanoparticles, agarose, adsorption isotherms.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
Introdução.....	2
Motivação.....	4
Objetivos.....	5
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	7
2.1. Espalhamento Raman.....	8
2.1.1. Histórico.....	8
2.1.2. O mecanismo para o espalhamento Raman.....	10
2.2. Espalhamento Raman Intensificado por Superfície (SERS).....	15
2.2.1. Histórico.....	15
2.2.2. Mecanismo eletromagnético (ME) para o efeito SERS.....	16
2.2.3. Mecanismo químico (MQ) para o efeito SERS.....	18
2.2.4. “Hot spots”.....	21
2.2.5. Algumas aplicações do efeito SERS.....	26
2.3. Agar, agar-agar ou agarose.....	26
2.3.1. Estrutura e propriedades.....	26
2.3.2. Utilização de nanopartículas dispersas em agarose.....	28
3. METODOLOGIA.....	31
3.1. Reagentes e procedimentos.....	31
3.1.1. Reagentes químicos.....	31
3.1.2. Procedimentos de limpeza.....	31
3.1.3. Preparo de soluções.....	31
3.2. Síntese dos substratos SERS ativos.....	32
3.2.1. Síntese das AgNPs/Coloide.....	32
3.2.2. Síntese das AgNPs/Agar.....	33
3.3. Caracterização dos materiais.....	33
3.3.1. Instrumentação.....	36
3.3.2. Medidas SERS, UV-Vis e MET com as AgNPs/Coloide.....	36

3.3.3. Medidas SERS, UV-Vis e MET com as AgNPs/Agar.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. AgNPs/Coloide como substrato SERS-ativo.....	39
4.1.1. Síntese e caracterização das AgNPs/Coloide.....	39
4.1.2. Estimativa da concentração de AgNPs.....	40
4.1.3. Adsorção de Rodamina 6G (R6G) em AgNPs/Coloide.....	42
4.2. AgNPs/Agar como substrato SERS-ativo.....	49
4.2.1. Síntese e caracterização das AgNPs/Agar.....	49
4.2.2. Caracterização dos adsorbatos utilizados (R6G, MB, CV, BTA).....	51
4.2.3. Adsorção de R6G em AgNPs/Agar.....	52
4.2.4. Adsorção de MB em AgNPs/Agar.....	59
4.2.5. Adsorção de CV em AgNPs/Agar.....	67
4.2.6. Adsorção de BTA em AgNPs/Agar.....	73
5. CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

1,4-BDT – *1,4-benzenoditiol*;

AgNPs – *Nanopartículas de prata*;

AgNPs/Agar – *Nanopartículas de prata dispersas em gel de agar (agarose)*;

AgNPs/Coloide – *Nanopartículas de prata em solução aquosa*;

BTA – *Benzotriazolato*;

BTAH – *Benzotriazol*;

CARS – *Espectroscopia Raman Anti-Stokes Coerente*;

CS – *Citrato de Sódio*;

CV – *Cristal Violeta*;

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*;

FI – *Fator de Intensificação*;

FT-Raman – *Fourier Transform Raman Spesctroscopy*;

HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital*;

IV – *Infravermelho*;

LbL – *Layer by Layer*;

LSPR – *Localized Surface Plasmon Resonances*;

LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*;

MB – *Azul de Metileno (Methylene Blue)*;

ME – *Mecanismo Eletromagnético*;

MET – *Microscopia Eletrônica de Transmissão*;

MQ – *Mecanismo Químico*;

NIR – *Infravermelho próximo*;

NPs - *Nanopartículas*;

PCEPE – *2-(4-piridil)-2-ciano-1-(4-etilfenil)etileno*;

R6G – *Rodamina 6G*;

RPM – *Rotações por Minuto*;

RRS – *Resonance Raman Scattering*;

SERS – *Surface-enhanced Raman Scattering*;

SERRS – *Surface-enhanced Resonance Raman Scattering;*

SPP – *Surface Plasmon Polariton;*

SMD – *Single Molecule Detection;*

SPR – *Surface Plasmon Resonances;*

SRS – *Stimulated Raman Scattering;*

TERS – *Tip-enhanced Raman Scattering;*

UV-Vis – *Ultravioleta-Visível;*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções estoques das moléculas investigadas.....	32
Tabela 2. Parâmetros de ajuste para as isotermas mostradas na Fig. 22.....	47
Tabela 3. Principais máximos de absorção observados nos espectros UV-Vis dos adsorbatos investigados em solução e adsorvidos em AgNPs/Agar, valores das respectivas constantes de dimerização, K_D , e teor relativo (%) de monômeros (M) e dímeros (D) nas concentrações de equilíbrio dos monômeros de $5,0 \times 10^{-4}$ M e $1,0 \times 10^{-5}$ M.....	52
Tabela 4. Parâmetros de ajuste para as isotermas mostradas na Fig. 31.....	59
Tabela 5. Parâmetros de ajuste para as isotermas do MB mostradas na Fig. 33.....	61
Tabela 6. Parâmetros de ajuste para as isotermas do CV mostradas na Fig. 40.....	68
Tabela 7. Parâmetros de ajuste para as isotermas mostradas na Fig. 46.....	75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do experimento realizado por C. V. Raman, no qual a luz solar, após passar por um filtro violeta, foi incidida na amostra que espalhava a luz em dois comprimentos de onda diferentes, no violeta e no verde, caracterizando os espalhamentos Rayleigh e Raman. Adaptado da ref. [3].....9
- Figura 2.** Representação dos espalhamentos elásticos (Rayleigh) e inelásticos (Raman), onde ν_0 é a frequência da radiação incidente e ν_m é a frequência da vibração molecular. Adaptado da ref. [8].....11
- Figura 3.** Representação esquemática dos mecanismos dos espalhamentos Rayleigh e Raman, onde $h\nu_0$ é a energia da radiação incidente, $h\nu$, é a energia da radiação espalhada.....14
- Figura 4.** Esquema representativo da oscilação do plasmon de superfície com o campo elétrico incidente. Adaptado das refs. [24 e 25].....16
- Figura 5.** Representação esquemática do mecanismo químico para o efeito SERS, no qual há a formação de um complexo de transferência de carga, representado pela ligação da piridina (Py) ao cluster de prata (Ag). E_F é o nível de Fermi da prata, LDS é a densidade de estados (ρ) doadores (abaixo de E_F) e receptores (acima de E_F) gerada durante o processo de ativação. Retirado da ref. [23].....19
- Figura 6.** Representação esquemática dos mecanismos de intensificação do efeito SERS, cuja expressão ($P = \alpha \cdot E_L$) representa a relação de cada mecanismo com o momento de dipolo induzido P . Adaptado da ref. [26].....21
- Figura 7.** Espectros SERS (excitação em 514.5 nm) do 1,4-BDT: (a,b) adsorvido num nanocubo de prata para duas orientações diferentes de polarização do laser em relação ao nanocubo; (c,d) adsorvido num dímero de nanocubos, para duas orientações diferentes de polarização do laser. As inserções são imagens MET, onde (1) indica a direção de polarização do laser em relação ao nanocristal e (2) a barra dimensional equivalente a 100 nm. Adaptado da ref. [32].....22
- Figura 8.** Micrografias MET de dois tipos de agregados de nanopartículas de Au (a esquerda) e os espectros de absorção dos LSPR correspondentes. Adaptado da ref. [33].....23
- Figura 9.** Espectros SERS (em vermelho) e de absorção (em azul) de para uma molécula hipotética adsorvida em dois tipos de agregados de AgNPs em regime de SMD. Ver texto para mais detalhes.....24
- Figura 10.** Representação esquemática da contribuição ressonante para os ramos anti-Stokes e Stokes do espalhamento Raman. As linhas de ressonância azul e vermelha representam transições

idealísticas e os dois espectros Raman mostram duas medidas experimentais em regime de uma molécula (SMD). Em azul, o lado anti-Stokes está dentro do perfil de ressonância justificando a maior intensificação do lado anti-Stokes do espectro SERRS, enquanto em vermelho, o lado Stokes está em ressonância e, portanto, existe uma intensificação preferencial para o ramo Stokes em comparação com o anti-Stokes. Adaptado da ref.[35].....25

Figura 11.Estrutura química de um monômero de agarose, composto principal do agar-agar natural, onde n é o número de monômeros ou cadeias.....27

Figura 12.Imagem do produto final da síntese de AgNPs/Coloide com adição de 14 μL de solução de NaCl 0,1 mol·L⁻¹.....33

Figura 13.(A) Imagem do produto final da síntese de AgNPs/Agar, (B) da síntese completa de AgNPs/Agar durante agitação magnética e (C) de AgNPs/Filme de Agar obtido por deposição de AgNPs/Agar por “spin coating”.....35

Figura 14.Micrografias das AgNPs/Coloide com aumento de 200 kV (a) e 400 kV (b) e histograma obtido pela medida de 300 partículas (c).....39

Figura 15.Espectro da absorção UV-vis das AgNPs/Coloide.....40

Figura 16.Espectros Raman das AgNPs/Coloide.....41

Figura 17.Espectros SERS de AgNPs/Coloide com R6G 1,0x10⁻⁸ M. (a) espectros simples são indicados pelo número de um total de 100 espectros. (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....42

Figura 18.Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados da Fig. 17(b).....43

Figura 19.Espectros SERS de AgNPs/Coloide com R6G 2,0x10⁻⁶ M. (a) espectros simples são indicados pelo número de um total de 100 espectros. (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....44

Figura 20.Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 19.....45

Figura 21.Dependência da intensidade SERS (a 612 cm⁻¹) na concentração da solução de R6G para a R6G adsorvida nas AgNPs/Coloide. As barras verticais correspondem ao desvio padrão da medida da intensidade média (triplicata).....46

Figura 22.Recobrimento da superfície (θ) as AgNPs/Coloide como uma função da concentração de R6G. (■) Dados experimentais; e ajustes para as isotermas de: (a) Freundlich; (b) Langmuir 1; (c) Langmuir 2; (d) Frumkin.....48

Figura 23.Micrografias das AgNPs/Agar com aumento de 200 kV (a) e 400 kV (b), histograma obtido pela medida de 300 partículas (c).....50

Figura 24.Espectros no UV-Vis das AgNPs/Coloide (- - -) e AgNPs/Agar.....50

Figura 25. Espectros UV-Vis das soluções dos adsorbatos (a) BTAH, (b) CV, (c) MB e (d) R6G puros na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ M (A); Do filme exposto a 3 gotas de 10^{-4} M de solução aquosa de adsorbato; (a) é o espectro do filme de AgNPs/Agar; (b) R6G; (c) MB; (d) CV e (e) BTA.....	51
Figura 26. Dependência da intensidade SERS (em 612 cm^{-1}) na concentração da solução de R6G para R6G adsorvida no substrato AgNPs/Agar.....	53
Figura 27. Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 28(b).....	54
Figura 28. Espectros SERS de AgNPs/Agar com R6G $1,0 \times 10^{-8}$ M. (a) espectros únicos são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem ao lado esquerdo indica a distribuição superficial da intensidade do sinal em aproximadamente 612 cm^{-1} e a imagem ao lado direito indica a distribuição superficial da intensidade do sinal em aproximadamente 242 cm^{-1} . (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....	55
Figura 29. Espectros SERS de AgNPs/Agar com R6G $2,0 \times 10^{-6}$ M; (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem ao lado esquerdo dá distribuição superficial dá intensidade do sinal em 612 cm^{-1} e a imagem ao lado direito dá a distribuição superficial da intensidade do sinal em 230 cm^{-1} ; (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....	56
Figura 30. Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 29(b).....	57
Figura 31. Recobrimento superficial (θ) para a R6G adsorvida em AgNPs/Agar como uma função da concentração de R6G. (■) Dados experimentais e curvas obtidas por ajuste dos pontos experimentais às isotermas de: (a) Langmuir 1; (b) Langmuir 2; (c) Frumkin.....	58
Figura 32. Dependência da intensidade SERS (em 1623 cm^{-1}) com a concentração de MB em solução para MB adsorvido no substrato AgNPs/Agar. A figura destacada mostra uma visão expandida da curva para $[\text{MB}] < 10^{-7}$ M. A linha tracejada é apenas um guia para os olhos.....	60
Figura 33. Recobrimento superficial (θ) do MB adsorvido em AgNPs/Agar como uma função da concentração de MB em solução. (■) Dados experimentais e curvas de ajuste dos pontos experimentais às isotermas: (a) Langmuir 1 – primeira monocamada; (b) Langmuir 2 – Segunda camada; (c) Frumkin – segunda camada. A figura em destaque mostra uma visão expandida da isoterma para concentrações abaixo de $1,0 \times 10^{-6}$ M.....	61
Figura 34. Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 35.....	63
Figura 35. Espectros SERS de AgNPs/Agar com MB $2,0 \times 10^{-8}$ M. espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. (a) A imagem ao lado esquerdo mostra a distribuição	

superficial da intensidade do sinal SERRS em ca. 1623 cm^{-1} e a imagem ao lado direito indica a distribuição superficial do sinal em ca. 243 cm^{-1} . (b) A imagem mostra a distribuição superficial da intensidade do sinal em ca. 479 cm^{-1}64

Figura 36. Espectros SERS de AgNPs/Agar com MB $2,0 \times 10^{-8}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem do lado esquerdo representa a distribuição superficial da intensidade do sinal SERRS em ca. 1623 cm^{-1} e a imagem ao lado direito representa a distribuição superficial da intensidade do sinal SERS em ca. 243 cm^{-1} referente ao estiramento Ag-Cl. (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....65

Figura 37. Espectros SERS de AgNPs/Agar com MB $4,0 \times 10^{-6}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem do lado esquerdo representa a distribuição superficial da intensidade do sinal SERRS em ca. 1623 cm^{-1} e a imagem ao lado direito representa a distribuição superficial da intensidade do sinal SERS em ca. 243 cm^{-1} referente ao estiramento Ag-Cl. (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....65

Figura 38. Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 37.....67

Figura 39. Intensidade SERRS (em 1173 cm^{-1}) de CV adsorvido no substrato como uma função da concentração de CV.....68

Figura 40. Recobrimento superficial (θ) para CV adsorvido em AgNPs/Agar como uma função da concentração de CV. (■) Dados experimentais; e curvas obtidas por ajustes dos pontos experimentais às isotermas: (a) Langmuir 1; (b) Langmuir 2; (c) Frumkin.....69

Figura 41. Espectros SERRS de AgNPs/Agar com CV $1,0 \times 10^{-8}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem à esquerda corresponde à distribuição superficial da intensidade SERRS do sinal em ca. 1173 cm^{-1} e a imagem à direita mostra a distribuição da intensidade SERS do sinal em ca. 243 cm^{-1} . (b) Médias de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....70

Figura 42. Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 36.....71

Figura 43. Espectros SERS de AgNPs/Agar com CV $2,0 \times 10^{-6}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem à esquerda corresponde à distribuição superficial da intensidade SERRS do sinal em ca. 1173 cm^{-1} e a imagem à direita mostra a distribuição da intensidade SERS do sinal em ca. 243 cm^{-1} . (b) Médias de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....72

Figura 44. Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 39.....73

Figura 45. Intensidade SERS (em 784 cm^{-1}) de BTA adsorvido em filme de AgNPs/Agar.....	74
Figura 46. Recobrimento superficial (θ) para o BTA adsorvido em AgNPs/Agar como uma função da concentração de BTA. (■) Dados experimentais; e curvas correspondentes ao ajuste dos pontos experimentais às isotermas: (a) Langmuir 1; (b) Langmuir 2; (c) Frumkin.....	75
Figura 47. Espectros SERS de AgNPs/Agar com BTA $8,0 \times 10^{-7}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem do lado esquerdo representa a distribuição da intensidade SERS do sinal em $ca. 782\text{ cm}^{-1}$ e a imagem do lado direito representa a distribuição superficial do sinal SERS em $ca. 242\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento Ag-Cl. (b) Médias de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....	76
Figura 48. Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados deu ma das réplicas da Fig. 47.....	77
Figura 49. Espectros SERS de AgNPs/Agar com BTA $1,0 \times 10^{-5}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem do lado esquerdo representa a distribuição superficial da intensidade do sinal em $ca. 784\text{ cm}^{-1}$ e a imagem do lado direito representa a distribuição superficial da intensidade do sinal em $ca. e 239\text{ cm}^{-1}$.. (b) Médias de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.....	78
Figura 50. Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 49.....	79

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Sempre houve na comunidade científica um grande interesse pelo conhecimento da composição e estrutura da matéria. Sendo assim, a criação de métodos de análise que permitissem a obtenção de informações acerca da estrutura molecular, ligações químicas e níveis de energia tornou-se alvo de intensos estudos. Dentre as várias técnicas existentes pode-se citar, por exemplo, a ressonância magnética nuclear, difrações de raios-X, nêutrons e elétrons, espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível e no infravermelho, espectroscopia Raman, entre outras, sendo a espectroscopia Raman o alvo deste trabalho.^{1,2}

A espectroscopia Raman durante muito tempo foi cercada por desafios que só começaram a ser solucionados com o advento dos lasers, que possibilitou a criação de novas técnicas com o objetivo de melhorar a qualidade do método.³⁻⁵ Neste sentido, a espectroscopia Raman e suas várias técnicas se tornaram ferramentas analíticas poderosas, por serem métodos de análise não invasivos, não destrutivos, que necessitam de pouco ou nenhum preparo de amostra e que permitem a identificação de substâncias orgânicas e inorgânicas.^{1,2} Graças à intensificação causada pelo efeito SERS (*Surface-enhanced Raman Scattering*), que pode chegar à ordem 10^{15} , hoje é possível detectar substâncias em níveis de concentração tão baixos quanto de uma molécula (*SMD -Single Molecule Detection*),⁶ fazendo com que a espectroscopia Raman seja equiparada à espectroscopia de fluorescência,³ desempenhando papel significativo em diversas áreas da química, biologia e medicina.^{5,6}

A partir da década de 1980 muitos pesquisadores dedicaram-se a entender o “novo fenômeno Raman de superfície”, entretanto, as aplicações analíticas do novo fenômeno começaram apenas na década de 1990.³⁻⁵ Usando instrumentos com óptica convencional (sem microscópios) e curvas de calibração (intensidade SERS vs. concentração do analito) foi possível a determinação de analitos em níveis de concentração da ordem de 10^{-6} M (ppm).⁷⁻¹⁰

Quando se utiliza a óptica convencional no efeito SERS, ou seja, quando a área iluminada da amostra não apresenta dimensões microscópicas, o feixe laser está irradiando uma área significativamente maior que aquela analisada pelo feixe de luz focado empregando uma objetiva de 50x, por exemplo. Consideremos o caso de um equipamento Raman com óptica convencional, em que o diâmetro do feixe laser na amostra seja de 3,0 mm, e outro equipamento equipado com microscópio com uma objetiva de 50x de aumento que gere um ponto focal na amostra com 3,0 μ m de diâmetro. A área amostrada no primeiro caso é 10^4 vezes maior que no segundo. Então os espectros obtidos em experimentos que utilizam a óptica convencional são, na verdade, uma média da área medida.¹¹⁻¹³

Até o presente, a literatura tem reportado observação de flutuações nas intensidades SERS somente para experimentos onde a radiação excitante é focalizada na amostra através de objetivas com 50x ou 100x de aumento e em concentrações muito baixas. Essas flutuações não são observadas em condições de macro-amostragem, pois o sinal SERS medido é uma média de todos

os sítios SERS-ativos presentes no sistema (solução coloidal, filmes metálicos, ou eletrodos), gerando um sinal SERS relativamente constante.¹¹⁻¹³

Um dos problemas em se usar soluções coloidais de nanopartículas de prata (AgNPs) como substrato é que tanto as AgNPs como as moléculas prova estão em constante movimento, o que no caso de excitação empregando objetivas de microscópio torna o processo estatístico, ou seja, o sinal será observado quando uma ou mais AgNPs contendo o adsorbato cruzarem a região onde o laser está incidindo. Portanto, um desafio para estudos SERS é conseguir que os sítios SERS-ativos fiquem confinados a uma região, o que acontece, por exemplo, com moléculas adsorvidas em filmes de prata depositados à vácuo ou em eletrodos de prata ativados por ciclos de oxidação redução. No entanto, em ambos os casos, o adsorbato permanece na superfície (e na solução no caso de eletrodos) podendo mudar sua localização). Assim, um dos desafios da técnica consiste em obter substratos com atividade SERS em que, tanto os sítios SERS-ativos, como os adsorbatos, permaneçam imóveis.

Sendo assim, neste trabalho foram desenvolvidos filmes de AgNPs dispersas em gel de agarose (AgNPs/Agar) e testados como substratos SERS-ativos pela adsorção de compostos modelos (R6G, MB, CV e BTA). Os resultados mostraram que este substrato é SERS-ativo e, além de fácil preparo, apresentou resultados semelhantes aos apresentados pelas AgNPs/Coloide, entretanto com sinais até 10 vezes mais intensos.

1.1 Motivação

Devido ao baixíssimo limite de detecção alcançado pelo efeito SERS (em nível SMD), o preparo de substratos SERS-ativos mais eficientes tem sido alvo de intensos estudos.⁶ Na busca crescente por estabilização e controle no tamanho das nanopartículas a utilização de matrizes poliméricas mostrou-se uma opção promissora. Neste sentido, o gel Agar (ou agarose) obteve grande visibilidade devido à sua capacidade de formar uma “armadilha molecular” que confina as nanopartículas em seus interstícios, possibilitando o controle do tamanho das nanopartículas, maior estabilização e durabilidade. Além disso, o gel Agar é um material de origem natural, quimicamente inerte, atóxico, de fácil degradação, baixo custo, geleifica a temperaturas ligeiramente altas e que possui viscosidade adequada para o controle de difusão de íons.^{14,15}

Ayyad et. al.¹⁶ utilizaram agarose na biorredução da prata para provar a eficiência da agarose no controle da forma e tamanho das nanopartículas. Neste trabalho, diferentes métodos foram utilizados na preparação dos géis, de forma que foram preparadas nanopartículas na presença e na ausência de agarose. Como resultados, a redução de prata na presença de agarose forneceu nanopartículas com maior diâmetro (15 nm) e com distribuição mais homogênea.

Lofrumento et. al.¹⁷ prepararam AgNPs (com diâmetro médio de 40 nm) através de redução por citrato de sódio e, em seguida, adicionaram agarose. O gel obtido foi usado para extrair corantes em amostra de tecido e foram realizadas medidas SERS nos géis utilizando radiação laser de 514,5 nm e 785 nm.

Saha et. al.¹⁸ utilizaram discos de agarose contendo AgNPs na análise de corantes (R6G, cristal violeta e alizarina) de tintas em papel e realizaram medidas SERS utilizando radiação laser de 514,5 nm e 785 nm.

Em ambos os trabalhos os géis obtidos e analisados apresentaram longa durabilidade (acima de 30 dias), podendo ser analisado novamente após determinado período e observando-se a presença do adsorbato. Neste sentido, o desafio proposto neste trabalho é o desenvolvimento de um método de preparação de substratos SERS-ativos baseados na dispersão de AgNPs em gel de agarose e avaliar sua efetividade estudando moléculas provas extensamente investigadas na literatura.

Objetivos

Na busca de um substrato SERS-ativo mais estável, de fácil preparo, fácil manuseio, alta durabilidade e que promova intensificação do sinal Raman em regiões variadas do espectro visível, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Preparar nanopartículas de prata (AgNPs) em gel de agarose;
- Caracterizar as AgNPs/Agar quanto à forma, tamanho e ressonâncias tipo SPR (*surface plasmon resonance*);
- Caracterizar as AgNPs/Agar como substrato SERS-ativo;
- Avaliar a efetividade das AgNPs/Agar como substrato SERS-ativo em relação às, já utilizadas, AgNPs/Coloide;
- Obter espectros SERS, em concentrações que variam de $1,0 \times 10^{-8}$ M a $1,0 \times 10^{-5}$ M, dos adsorbatos R6G (rodamina 6G), MB (azul de metileno), CV (cristal violeta) e BTA (benzotriazolato) utilizando AgNPs/Agar como substrato SERS-ativo;
- Estudar o comportamento (como a intensidade SERS varia em função da concentração) de R6G, MB, CV e BTA adsorvidos em AgNPs/Agar;
- Ajustar as curvas obtidas a partir das medidas SERS dos adsorbatos utilizando modelos de isotermas de adsorção.

CAPÍTULO 2
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A matéria é constituída, entre outras partículas, por elétrons, átomos, íons, ou moléculas. A energia dessas partículas é quantizada, ou seja, suas energias não podem assumir qualquer valor, pois estão distribuídas em níveis de energia. A espectroscopia é o ramo da ciência que envolve o estudo da interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, fornecendo informações sobre os níveis de energia das partículas que constituem a matéria. Os espectros, curvas de intensidade vs. energia, fornecem informações acerca das diferenças de energia entre os diversos níveis energéticos e a partir destas medidas é possível prever suas posições relativas. Assim, na espectroscopia faz-se uso de radiação eletromagnética para promover a transição entre esses níveis de energia. Essas transições podem ser do tipo, nuclear, eletrônico, vibracional, rotacional, de spin, etc.¹

Dependendo da energia da radiação eletromagnética, esta pode promover (excitar) diferentes transições no material que está sendo investigado. Por exemplo, no caso de moléculas no estado gasoso, radiação eletromagnética na região do infravermelho pode excitar transições vibracionais e rotacionais. No caso de átomos, íons ou moléculas formando um retículo cristalino, esse tipo de perturbação pode promover a excitação de fônons.¹

Neste trabalho estaremos investigando o resultado da interação entre a radiação eletromagnética e a matéria na região do UV-Vis (200 a 700 nm), responsável por transições eletrônicas envolvendo elétrons de valência, e no infravermelho (IV – 400 a 4000 cm^{-1}), onde transições vibracionais serão observadas. Um caso particular da excitação na região do visível é a espectroscopia Raman, que também fornece informações sobre transições vibracionais, entre outras.^{1,2}

Para que uma determinada transição possa ser excitada por radiação eletromagnética existem alguns critérios a serem obedecidos, os quais são chamados de regras de seleção. No caso do IV, a energia do fóton incidente tem que coincidir com a diferença de energia entre os estados vibracionais envolvidos e durante a vibração deve haver variação do momento de dipolo. Como resultado dessas regras, os espectros no IV podem mostrar absorções resultantes de transições envolvendo modos vibracionais fundamentais, harmônicos e combinações.²

Na espectroscopia de absorção no IV podem ser obtidas informações quantitativas e qualitativas, tais como identificação de grupos constituintes da molécula, da geometria molecular, efeitos de mudança de fase, de solvente, da temperatura, da adição de reagentes, entre outras.¹

Na espectroscopia Raman, como descrito mais adiante, o processo de interação da radiação com a matéria envolve dois fótons, um fóton que é absorvido e, depois de um tempo muito pequeno, da ordem de 10^{-14} s, outro fóton que é “emitido” ou espalhado, com energia diferente da energia do fóton incidente. Pode-se dizer que a espectroscopia Raman é uma forma indireta de observar os espectros vibracionais, transferindo as informações que seriam obtidas na região do infravermelho para a região do visível. Os mesmos valores de frequências vibracionais podem ser obtidos através dos espectros Raman e no infravermelho, dependendo da estrutura (simetria) da molécula envolvida.

Por exemplo, no caso de moléculas com baixa simetria, a coincidência nos modos vibracionais observados é bem maior do que no caso de moléculas com alta simetria. Assim, nas moléculas com centro de simetria (ou centro de inversão) os modos vibracionais ativos (observados) no IV não são ativos no Raman e vice-versa, uma vez que os modos vibracionais simétricos em relação ao centro de simetria serão ativos no Raman, mas não serão ativos no IV por não haver variação do momento de dipolo durante a vibração.^{1,2}

A espectroscopia Raman também permite obter dados quantitativos e qualitativos, entre os quais destacamos dados sobre a geometria molecular, valores de constantes de força de ligações químicas, efeitos de solvente, temperatura, entre outros.¹

2.1 Espalhamento Raman

2.1.1 Histórico

O efeito Raman foi previsto teoricamente por Smekal, em 1923, e, posteriormente, por Kramers e Heisenberg, em 1925, em trabalhos clássicos baseados na mecânica quântica. No entanto, o fenômeno só foi observado experimentalmente, pela primeira vez, em 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman, que em 1930 recebeu o prêmio Nobel de física por seus trabalhos sobre espalhamento de luz.¹⁹

Raman, desde muito jovem, a partir dos 13 anos de idade, demonstrou interesse pela ciência e trabalhou durante muitos anos em pesquisas na área da acústica. Após frustrados anos trabalhando no Departamento Financeiro Indiano, Raman resolveu dedicar-se apenas à carreira acadêmica, e então se tornou Professor de Física da Universidade de Calcutta. Em 1921 viajou à Europa para conduzir pesquisas sobre acústica em um congresso britânico, e lá conheceu três ilustríssimos físicos, Joseph J. Thomson, Ernest Rutherford e William H. Bragg. Contudo, foi a viagem de volta para Calcutta que mudou a vida de C. V. Raman.²⁰

Durante a viagem marítima, maravilhado pela bela cor azul do mar Mediterrâneo, indagou-se sobre a origem desse fenômeno. Segundo Rayleigh, a cor azul do mar era proveniente do reflexo da cor azul do céu. Entretanto, Raman, não concordava com esta interpretação. Então, com um prisma de Nicol de bolso, ele descobriu que a explicação de Rayleigh estava incorreta, pois ao eliminar a reflexão superficial do céu na superfície do mar, a coloração azul não mudou. A seguir, usando uma rede de difração, Raman mostrou que a intensidade da radiação azul proveniente do céu era diferente da intensidade da radiação azul proveniente do mar. Sendo assim, ele explicou que o mar tinha coloração azul devido ao espalhamento de luz pelas moléculas de água, um fenômeno conhecido como difração molecular. Durante esta viagem C. V. Raman escreveu dois artigos e iniciou seu interesse pela base molecular do espalhamento de luz.²⁰

Em 1927, C. V. Raman e K. S. Krishnan observaram a luz espalhada com frequência deslocada de mais de 50 líquidos puros, e perceberam que a luz espalhada era polarizada. Em seus experimentos, a luz solar, policromática, passava por um filtro violeta, que permitia a passagem de luz violeta, e esta era incidida na amostra de um líquido que, por sua vez, espalhava a luz a 90 graus com duas intensidades diferentes. A primeira com a mesma intensidade da radiação incidente, luz violeta, caracterizando o espalhamento como elástico, ou espalhamento Rayleigh, e a segunda com intensidade modificada, luz verde, caracterizando o espalhamento como inelástico, ou espalhamento Raman,^{19,20} conforme ilustrado na Fig. 1.

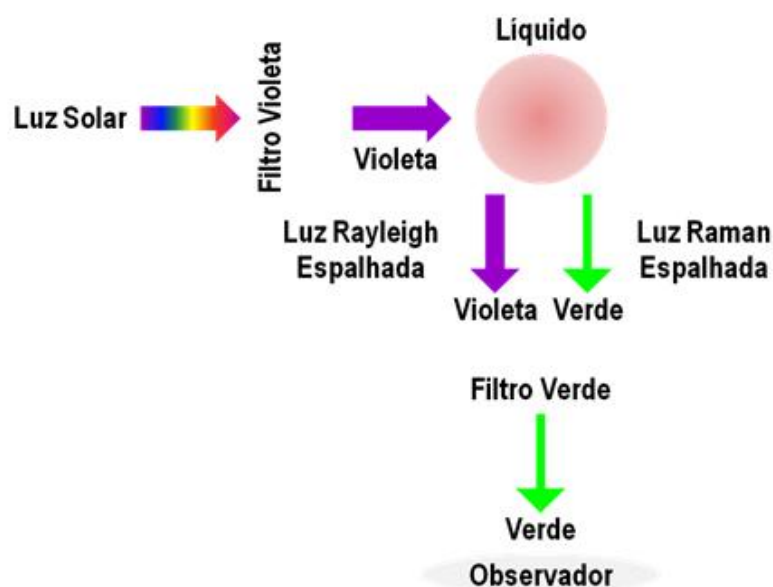


Figura 1: Esquema do experimento realizado por C. V. Raman, no qual a luz solar, após passar por um filtro violeta, incide na amostra que espalhava a luz em dois comprimentos de onda diferentes, no violeta e no verde, caracterizando os espalhamentos Rayleigh e Raman. Adaptado da ref. [19].

Em 1928, Raman e Krishnan publicaram um trabalho referente à descoberta de um “novo tipo de radiação secundária”¹⁹⁻²¹ e, em 1930, este trabalho rendeu a Raman o Prêmio Nobel em Física, e o fenômeno descrito foi denominado como Efeito Raman, em sua homenagem.²⁰

Durante a década de 1930, a espectroscopia Raman foi reconhecida como uma das principais técnicas de análise não-destrutivas, no entanto a técnica não estava livre de críticas e desafios. Dentre eles a falta de uma boa fonte de radiação, a falta de um bom detector e a interferência da fluorescência, que, em muitos casos, se sobrepõe ao sinal Raman, mascarando-o.³ Essas limitações inibiram o emprego da técnica pela comunidade científica. No entanto, a partir da década de 60, com o advento dos lasers e de sistemas de detecção mais sensíveis, o efeito Raman convencional e o efeito Raman ressonante passaram por um renascimento e, além disso, novas técnicas, baseadas no efeito Raman foram criadas, como por exemplo, a espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman),^{3,4} a espectroscopia Raman anti-Stokes coerente (CARS –

Coherent Anti-Stokes Raman Scattering), a espectroscopia Raman estimulada (SRS – Stimulated Raman Scattering), o espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS – Surface-Enhanced Raman Scattering) e a espectroscopia TERS (Tip-enhanced Raman Scattering) que é uma derivação do efeito SERS, entre outras.^{3,5}

Atualmente, a espectroscopia Raman tem se mostrado uma ferramenta analítica poderosa na investigação de diferentes materiais, substâncias e misturas em diversas áreas do conhecimento.³ A partir do efeito Raman, nas suas mais variadas vertentes, pode-se obter informações acerca da estrutura, ambiente eletrônico e ligações químicas existentes em moléculas e compostos, no intuito de qualificar ou quantificar substâncias de forma não invasiva e não destrutiva.²²

2.1.2 O mecanismo para o espalhamento Raman

Diferentemente da espectroscopia na região do infravermelho, que envolve apenas a absorção do fóton responsável pela excitação vibracional, na espectroscopia Raman o processo de espalhamento de luz envolve dois fótons, o fóton incidente e o fóton da radiação espalhada, cuja energia é diferente de um quantum vibracional da energia do fóton incidente.^{1,2}

Quando a radiação eletromagnética, correspondente a um feixe de luz monocromática, incide sobre uma amostra, esta interage com as moléculas presentes na amostra. Se a energia do fóton incidente for suficiente, esta poderá interagir com a molécula de forma a promover uma mudança de estado, isto é, a molécula poderá passar do estado fundamental para o estado excitado. Esta energia pode ser prevista pela Eq. (1), onde ΔE é a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado, h é a constante de Planck e ν é a frequência da radiação incidente. No entanto, na maioria dos casos, a radiação incidente não coincide com as energias que promovem transições moleculares, fazendo com que esta radiação seja espalhada sem interagir com as moléculas, de forma que os fótons espalhados têm mesma energia que os fótons incidentes. Este espalhamento, elástico, é conhecido como espalhamento Rayleigh.^{1,2,5}

$$\Delta E = h\nu \quad (1)$$

Na minoria dos casos, os fótons incidentes interagem com as moléculas da amostra, podendo promover mudanças de estados vibracionais. Neste caso, a energia dos fótons espalhados é diferente da energia dos fótons incidentes. Este processo de espalhamento, inelástico, é conhecido como espalhamento Raman.^{1,2,5}

Consideremos o caso da Fig. 2 que ilustra uma molécula diatômica vibrando em seu estado vibracional fundamental. Quando os fótons da radiação incidente interagem com os elétrons dessa molécula, ela passa a um estado eletrônico excitado. Após um curto período de tempo, da ordem de 10^{-14} segundos, a molécula volta ao seu estado eletrônico fundamental, espalhando um fóton e

deixando a molécula em um estado vibracional excitado. Neste caso, o fóton espalhado (emitido) tem energia menor que a do fóton incidente e essa diferença de energia corresponde a um quantum vibracional, $h\nu_m$. Este processo é denominado espalhamento Raman-Stokes.⁵ Não obstante, se a molécula já se encontra num estado vibracional excitado, o fóton incidente promove a mudança de estado eletrônico e na volta ao estado fundamental (eletrônico e vibracional) um quantum vibracional, $h\nu_m$, é transferido ao fóton espalhado. Neste caso, a energia do fóton espalhado será maior que a do fóton incidente, e o processo é denominado como espalhamento Raman anti-Stokes.^{22,23}

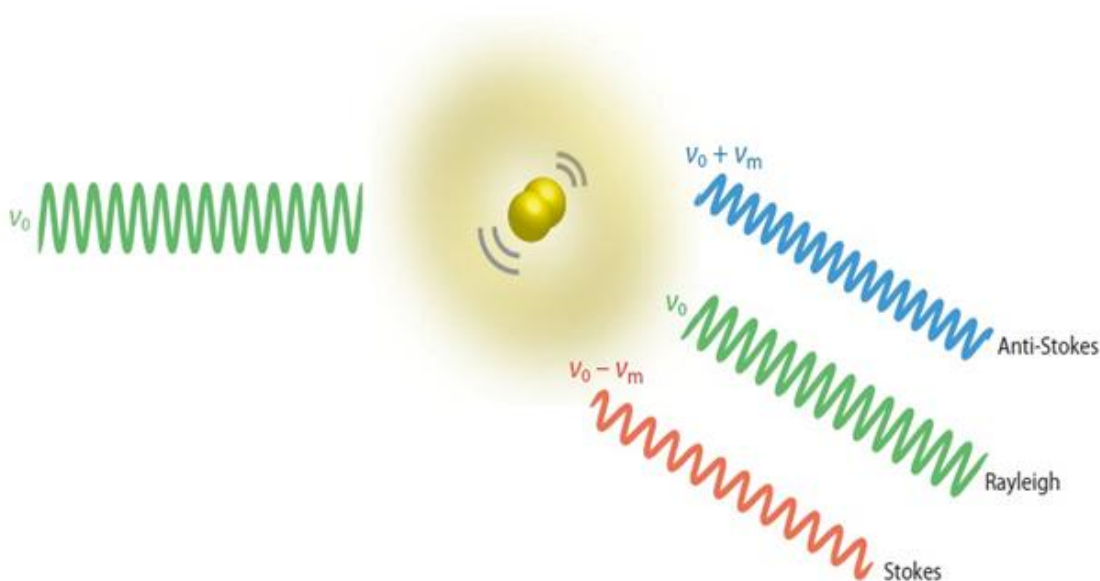


Figura 2: Representação dos espalhamentos elásticos (Rayleigh) e inelásticos (Raman), onde ν_0 é a frequência da radiação incidente e ν_m é a frequência da vibração molecular. Adaptado da ref. [5].

Segundo Raman e Krishnan, a intensidade do espalhamento Rayleigh é 10^6 a 10^9 vezes maior que a intensidade do espalhamento Raman.²³ Neste sentido, o uso de lasers de alta potência associados a sistemas de filtros do tipo notch e o uso de detectores multicanais de alta eficiência são indispensáveis para uma melhor detecção de sinais Raman.¹

Quando uma molécula é exposta a um campo eletromagnético E , o núcleo da molécula é atraído pelo polo negativo da onda eletromagnética e os elétrons pelo polo positivo, que faz com que a molécula passe a ter um momento de dipolo P induzido pela radiação eletromagnética.^{1,2} Este momento de dipolo induzido (P) é dado pela Eq. (2) e a intensidade Raman é proporcional ao quadrado de P .^{1,5}

$$P = \alpha E \quad (2)$$

onde P é o momento de dipolo elétrico induzido, α é o tensor de polarizabilidade da molécula e E é o campo elétrico local.^{1,5}

Segundo a descrição da física clássica, α pode ser desenvolvido em série de Taylor em função da coordenada normal interna q , conforme a Equação (3):¹

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \dots \quad (3)$$

A coordenada normal q e o vetor campo elétrico E são descritos pelas Equações (4) e (5):^{1,2}

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \quad (4)$$

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (5)$$

onde ν_v é a frequência vibracional e ν_0 é a frequência da radiação incidente, de forma que substituindo as equações anteriores na Equação (2) e rearranjando-a, o momento de dipolo induzido será expresso por:¹

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \} \quad (6)$$

O primeiro termo do segundo membro da Eq. (6) refere-se ao espalhamento Rayleigh, pois contém apenas a frequência da radiação incidente, ν_0 . O segundo termo refere-se ao espalhamento Raman anti-Stokes, $(\nu_0 + \nu_v)$ e Stokes, $(\nu_0 - \nu_v)$. Para que o segundo termo tenha contribuição não nula é necessário que haja uma pequena variação da polarizabilidade da molécula induzida pela radiação eletromagnética, ou seja, um pequeno deslocamento, em relação à posição de equilíbrio, da coordenada q , de forma que $(d\alpha/dq)_0 \neq 0$.¹

Uma vez que no espalhamento Raman a molécula é excitada pelo fóton incidente, a vibração resultante induz um momento de dipolo na molécula nas direções x , y e z . Assim, o momento de dipolo para cada direção será descrito por:¹

$$\begin{aligned} P_x &= \alpha_{xx} E_x + \alpha_{xy} E_y + \alpha_{xz} E_z \\ P_y &= \alpha_{yx} E_x + \alpha_{yy} E_y + \alpha_{yz} E_z \\ P_z &= \alpha_{zx} E_x + \alpha_{zy} E_y + \alpha_{zz} E_z \end{aligned} \quad (7)$$

Estas equações são válidas para o espalhamento Rayleigh onde a polarizabilidade intrínseca é considerada. Entretanto, para o espalhamento Raman, devem ser consideradas as derivadas de α ($\alpha'_{ij} = (d\alpha_{ij}/dq)_0$, onde i e j são x, y ou z) em relação ao modo vibracional, que formam um tensor simétrico conhecido como tensor Raman, tal que $\alpha'_{xy} = \alpha'_{yx}$, $\alpha'_{xz} = \alpha'_{zx}$ e $\alpha'_{yz} = \alpha'_{zy}$, resulta em 6 integrais do momento de transição. Assim, para que uma transição entre os estados vibracionais m e n , onde m é o estado vibracional inicial e n o estado vibracional excitado, seja ativa no Raman, pelo menos uma das componentes das 6 integrais do momento de transição deve ser diferente de zero, e esta regra compõe uma das regras de seleção do espalhamento Raman.¹

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \Psi_m \alpha_{ij} \Psi_n d\tau \quad (8)$$

Sendo α desenvolvido em série de Taylor, teremos que:¹

$$(\alpha_{ij})_{mn} = (\alpha_{ij})_0 \int \Psi_m \Psi_n d\tau + \left(\frac{d\alpha_{ij}}{dq} \right)_0 \int \Psi_m q \Psi_n d\tau \quad (9)$$

Caso os estados vibracionais final e inicial sejam iguais, ou seja, $m = n$, o primeiro termo será a contribuição do espalhamento Rayleigh. No espalhamento Raman, tanto Stokes quanto anti-Stokes, os estados vibracionais final e inicial são diferentes, de forma que a primeira integral será igual a zero. Portanto, para que o segundo termo seja diferente de zero, as seguintes condições, que compõe as regras de seleção para o espalhamento Raman, deverão ser satisfeitas:

- (1) $(d\alpha_{ij}/dq)_0 \neq 0$, ou seja, a radiação eletromagnética deve induzir variação na polarizabilidade da molécula, isto é, deve haver variação da polarizabilidade durante a vibração, ou seja, durante a variação da coordenada q em torno da posição de equilíbrio;
- (2) $\int \Psi_m q \Psi_n d\tau \neq 0$, ou seja, m deve ter paridade diferente de n , para que o produto da integral seja uma função par, uma vez que q é uma função ímpar.¹

O espalhamento Raman também pode ser descrito de forma mecânico-quântica, através da expressão de Kramers-Heiseberg-Dirac, onde o tensor de polarizabilidade é expresso por:¹⁹

$$\alpha_{\rho\sigma} = \sum_{e \neq m, n} \left\{ \frac{\langle m | D_{me} | e \rangle \langle e | D_{en} | n \rangle}{E_e - E_m - h\nu_0 - i\Gamma_e} + \frac{\langle m | D_{me} | e \rangle \langle e | D_{en} | n \rangle}{E_e - E_n + h\nu_0 - i\Gamma_e} \right\} \quad (10)$$

onde $\alpha_{\rho\sigma}$ é a componente $\rho\sigma$ (x, y, z) do tensor de polarizabilidade, m e n são os estados vibracionais inicial e final do estado eletrônico fundamental, respectivamente, e é um estado eletrônico de maior

energia, diferente do estado eletrônico fundamental, D é o momento de dipolo de transição entre os estados eletrônicos envolvidos, ν_0 é a frequência da radiação incidente, E_e é a energia do estado eletrônico e e E_m é a energia do estado inicial (eletrônico e vibracional) e Γ_e é uma constante relacionada ao tempo de vida do estado e . Se $m = n$, temos o espalhamento Rayleigh, para $m \neq n$ podemos ter o espalhamento Raman-Stokes ou anti-Stokes (Fig. 3). Fora de ressonância, o estado e é um estado virtual, ou seja, não corresponde a um estado eletrônico real da molécula.¹⁹

Finalmente, a intensidade da radiação espalhada pode ser representada por:¹

$$I_s \propto (\delta\alpha/\delta q)_0^2 I_0 \nu_s^4 \quad (10)$$

Ou seja, a intensidade da radiação espalhada é dependente da variação da polarizabilidade durante a vibração e proporcional à intensidade da radiação incidente, I_0 , e da frequência da luz espalhada, ν_s .

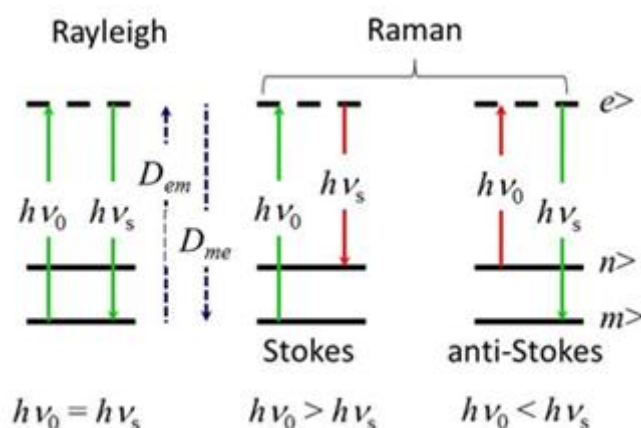


Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos dos espalhamentos Rayleigh e Raman, onde $h\nu_0$ é a energia da radiação incidente, $h\nu_s$ é a energia da radiação espalhada.

Um caso particular do efeito Raman, entre outros, é o efeito Raman ressonante, que pode ser observado quando a energia da radiação incidente é igual ou se aproxima à diferença da energia entre os dois estados eletrônicos envolvidos na transição. Neste caso, o estado e , na Eq. (3) e na Fig. 3, é um estado real da molécula. Portanto, o termo $E_e - E_m - h\nu_0$ na Eq. (10) tenderá a zero, promovendo uma intensificação da intensidade Raman, desde que a transição eletrônica seja permitida.^{1,2} Existem muitos aspectos relativos ao efeito Raman ressonante, mas uma abordagem mais ampla desse fenômeno foge ao escopo deste trabalho. No entanto, indica-se ao leitor a ref. [19] para uma descrição mais detalhada do fenômeno.

2.2 Espalhamento Raman Intensificado por Superfície (SERS)

2.2.1 Histórico

O espalhamento Raman intensificado por superfície, conhecido pela sigla em inglês SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering*), é observado quando se utilizam superfícies metálicas rugosas, de ordem nanométrica, para realizar medidas Raman, de forma que as moléculas do analito (adsorbato) adsorvem na superfície metálica (substrato SERS-ativo), resultando em um espectro Raman com sinais intensificados.^{24,25}

O fenômeno foi primeiramente observado, em 1974, por Fleischmann e colaboradores que utilizaram a espectroscopia Raman no estudo de espécies adsorvidas em eletrodos ativados por ciclos de oxidação-redução. Os ciclos de oxidação-redução foram utilizados para depositar prata sobre o eletrodo a fim de aumentar a área superficial e criar uma superfície rugosa, para possibilitar maior adsorção de moléculas de piridina, uma vez que a intensidade Raman é estritamente dependente da concentração de moléculas espalhadoras, e um melhor espectro Raman foi gerado. Contudo, a intensificação do sinal Raman, observado para a piridina adsorvida em eletrodo de prata, foi atribuída apenas ao aumento da superfície de contato promovida pela maior área superficial do eletrodo.²⁴

Mais tarde, em 1977, em trabalhos independentes, Van Duyne e colaboradores²⁵ e Creighton e colaboradores⁷ mostraram que a intensificação do sinal Raman observado para piridina adsorvida em eletrodo rugoso de prata, se tratava de um novo fenômeno de superfície, que causava a intensificação do sinal Raman por um fator da ordem de 10^5 a 10^6 .

Como será visto mais adiante, dependendo do tipo de superfície e da espécie adsorvida, a intensificação do sinal Raman pode chegar a ser da ordem de 10^9 vezes, tornando a espectroscopia Raman uma ferramenta analítica muito poderosa, com potencial para detecção em nível de uma molécula (SMD – *Single Molecule Detection*),⁶ ou seja, tão sensível quanto a espectroscopia de fluorescência.^{6,26-28} Outra vantagem do efeito SERS é que o sinal da fluorescência, de espécies altamente fluorescentes, quando adsorvidas em superfícies SERS-ativas, diminui consideravelmente e pode até ser totalmente suprimido.²⁹

Poucos metais permitem a observação do efeito SERS e, dentre eles, a prata, o ouro e o cobre são os que mais se destacam, devido à alta refletividade óptica e à excitação do plasmon de superfície ocorrer na região do visível, sendo a prata o metal que produz maior fator de intensificação, seguido do cobre e do ouro. Entretanto, outros metais já foram utilizados como substratos SERS-ativos, como por exemplo, Ni, Pt, Pd, Cd, Zn, Ga e In.^{10,30,31} Vários mecanismos foram propostos para explicar o efeito SERS, porém apenas os mecanismos eletromagnético e químico obtiveram maior consenso na comunidade científica.¹⁰

O mecanismo eletromagnético (ME) explica o efeito SERS como sendo oriundo da intensificação do campo elétrico local por meio da interação do campo elétrico da radiação incidente com a superfície metálica nanoestruturada. Já o mecanismo químico (MQ) explica que o efeito SERS se deve principalmente ao aumento da seção de choque Raman, causado pela formação de um complexo de transferência de carga através da ligação metal-adsorbato.^{10,30-33}

2.2.2 Mecanismo eletromagnético (ME) para o efeito SERS

O ME envolve a excitação de plasmons de superfície (SPP – *Surface Plasmon Polariton*). O SPP é criado quando a radiação incidente excitante interage com o “gás” de elétrons da superfície metálica, formando assim uma onda oscilante de elétrons, conforme mostrado na Fig.4. O SPP tem duas componentes, uma paralela e outra perpendicular à superfície. Devido à regra de conservação de momento, o SPP não pode se tornar radiativo (emitido) em superfícies lisas, uma vez que neste caso a componente perpendicular do SPP é desprezível. A existência de rugosidade na superfície (superfícies metálicas nanoestruturadas) pode gerar SPP com componente perpendicular significativa.³² Após interação do SPP com a molécula adsorvida, este pode ser emitido, tanto com a energia do fóton incidente ($h\nu_0$), fóton Rayleigh, como com a energia do fóton Raman ($h\nu_0 - h\nu_m$ ou $h\nu_0 + h\nu_m$).³³

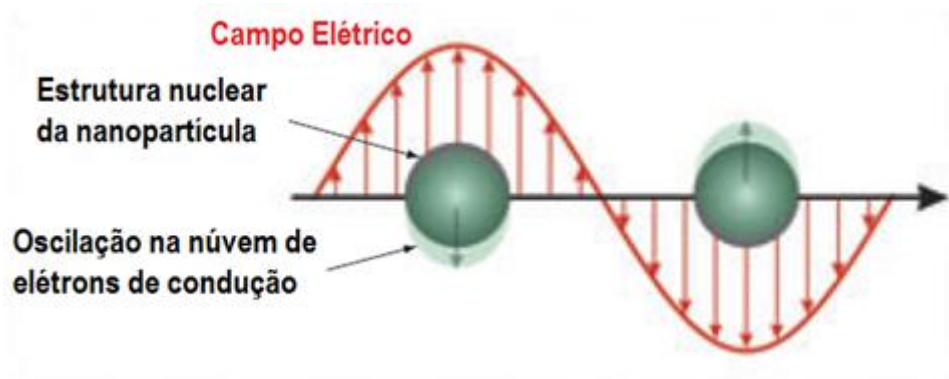


Figura 4: Esquema representativo da oscilação do plasmon de superfície com o campo elétrico incidente. Adaptado das Refs.[34 e 35].

Resgatando a Eq. (2), o mecanismo eletromagnético é assim conhecido por considerar que a intensificação do sinal Raman ocorre via intensificação do campo elétrico local, mediante a oscilação, em fase, do gás de elétrons de condução com o campo elétrico da radiação incidente. Mais precisamente, a intensificação ocorre via amplificação ressonante do campo elétrico externo, E_{out} , que é dado por:³⁴

$$E_{out} = E_0 k + \alpha E_0 k' \quad (11)$$

onde o primeiro termo é o campo elétrico da radiação incidente, E_0 , e o segundo termo é o momento de dipolo induzido, onde k e k' representam um conjunto de coordenadas cartesianas que definem a geometria de excitação em relação à esfera metálica (representando a superfície SERS-ativa) e α é o tensor de polarizabilidade da nanopartícula metálica, que, no caso de uma nanopartícula esférica pode ser descrita como:³⁴

$$\alpha_m = g a^3 \quad (12)$$

onde α_m é a polarizabilidade da nanopartícula esférica, a é o raio da esfera e g é dado por:³⁴

$$g = \frac{\varepsilon_i - \varepsilon_0}{\varepsilon_i + 2\varepsilon_0} \quad (13)$$

onde ε_i e ε_0 são as constantes dielétricas no interior da nanopartícula metálica e do meio dielétrico (vácuo ou solvente) onde esta se encontra, respectivamente.

Note que a condição de ressonância é aquela em que a parte real de ε_i seja igual a $-2\varepsilon_0$ e que, ao mesmo tempo, a parte imaginária de ε_i seja muito pequena. Essa condição é atingida para metais com alta refletividade, como prata, ouro e cobre. Essa é, portanto, a condição de ressonância para a excitação ressonante do plasmon de superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*). A densidade de estados ressonantes tipo SPR em sistemas SERS-ativos pode ser medida através do espectro de absorção no UV-Vis-NIR. Por exemplo, dependendo do tamanho, forma e estado de agregação das nanopartículas de prata (AgNPs), os SPRs podem absorver em comprimentos de onda tão curtos como 385 nm ou até no infravermelho próximo.³⁵

Quanto mais heterogênea é a distribuição, do tamanho e forma, e grande o estado de agregação das AgNPs, mais indefinida fica a banda de absorção correspondente à excitação dos SPRs. Sempre que a radiação laser incidente coincide com uma dessas ressonâncias, a excitação dos SPRs promove uma intensificação do campo elétrico local que pode chegar até a 10^6 ordens de grandeza. A intensificação é observada tanto para o campo elétrico da radiação incidente, como para a radiação espalhada.^{34,35}

Segundo o ME, não é necessário que a molécula esteja em contato direto com a superfície metálica, razão pela qual este mecanismo é conhecido como intensificação de longo alcance.^{34,35}

2.2.3 Mecanismo químico (MQ) para o efeito SERS

O mecanismo químico (MQ), também conhecido por mecanismo de transferência de carga, sugere que a molécula (adsorbato), ou molécula espalhadora, está ligada quimicamente à superfície do metal formando um complexo de transferência de carga. Tal complexo de transferência de carga pode ser formado por simples adsorção, interações eletrostáticas ou até mesmo pela formação de ligações químicas, de forma que, no processo de transferência de carga, o nível doador do orbital molecular tem uma maior contribuição do metal e o nível receptor tem uma maior contribuição da molécula espalhadora (ligante). Visto que o MQ explica a intensificação pela formação de um complexo de transferência de carga e exige a interação direta entre a molécula espalhadora e a superfície metálica, este mecanismo é de curto alcance.³²

Quando a radiação excitante interage com o metal ocorre a formação de um par elétron-lacuna. Tanto o elétron, como a lacuna, podem ser transferidos para a espécie adsorvida. Na transferência eletrônica, o elétron pode ocupar estados receptores da espécie adsorvida, enquanto no caso das lacunas, elétrons são transferidos a partir de estados doadores da molécula para estados receptores do metal.³² Tanto num caso, como no outro, após um determinado tempo de interação, o par elétron-lacuna se recombina emitindo radiação com a mesma energia do fóton incidente ($h\nu_0$ – espalhamento Rayleigh), ou com a energia do fóton Raman ($h\nu_0 - h\nu_m$ ou $h\nu_0 + h\nu_m$). A intensificação do sinal Raman via mecanismo químico pode chegar a ser da ordem de 10^3 .³³

A Fig. 5 mostra um exemplo do MQ utilizando como substrato SERS-ativo um eletrodo rugoso de prata, ativado por ciclos de oxidação-redução, e a piridina como espécie adsorvida. Neste caso, o complexo de transferência de carga é composto pelos clusters de Ag, suportados na superfície sólida do eletrodo de Ag, ligado à piridina, de forma que o orbital molecular HOMO, com maior contribuição por parte da Ag, doa um elétron para o orbital molecular LUMO, com maior contribuição da piridina. Assim, durante o processo de excitação do par elétron-lacuna pelo fóton incidente, o elétron transfere um quantum de energia vibracional para a piridina adsorvida, deixando-a vibracionalmente excitada. Desta forma, com a recombinação do par elétron-lacuna o fóton será emitido (espalhado) com a energia diferente em relação ao fóton incidente, sendo a diferença equivalente a um quantum vibracional da piridina adsorvida.^{31,33}

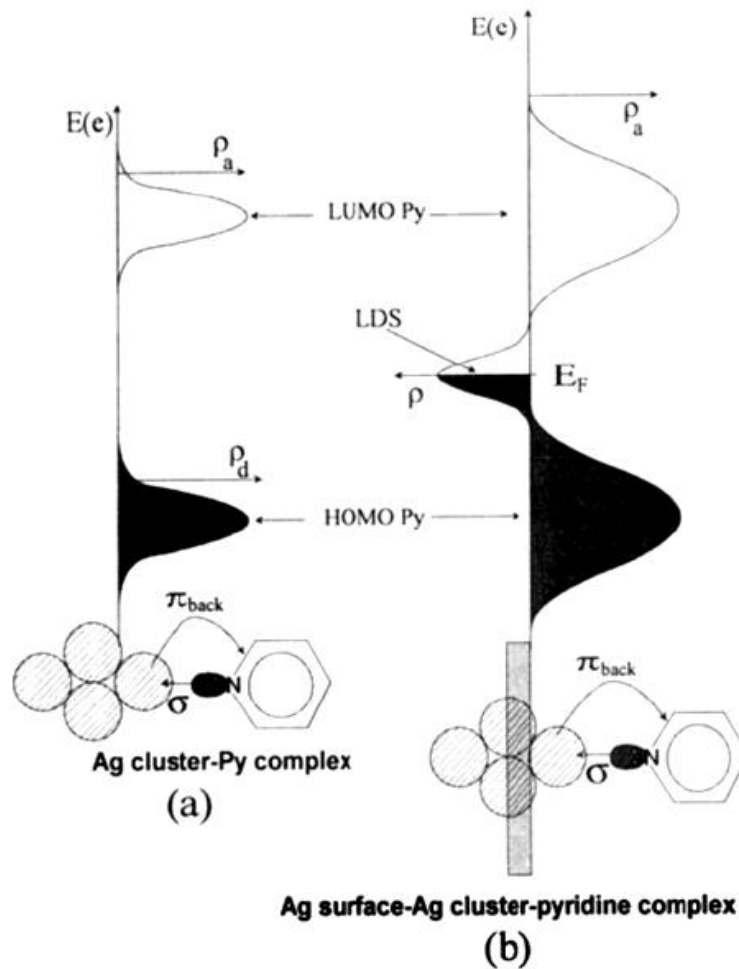


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo químico para o efeito SERS, no qual há a formação de um complexo de transferência de carga, representado pela ligação da piridina (Py) ao cluster de prata (Ag). E_F é o nível de Fermi da prata, LDS é a densidade de estados (ρ) doadores (abaixo de E_F) e receptores (acima de E_F) gerada durante o processo de ativação. Retirado da Ref. [33].

Quando a energia da radiação incidente se aproxima ou se torna igual à diferença de energia entre esses estados doadores e receptores, ocorre um efeito de intensificação semelhante ao efeito Raman ressonante.³³

Como o mecanismo eletromagnético pode contribuir com um fator de intensificação de até 10^6 e o químico com um fator de até 10^3 , a combinação desses dois mecanismos, o que ocorre em diversos sistemas, pode levar a uma intensificação total de 10^9 , o que possibilita a detecção de espécies adsorvidas em sistemas SERS-ativos em nível de uma única molécula (SMD – *Single Molecule Detection*).⁶ Contudo, já foram reportados trabalhos com fator de intensificação total da ordem de 10^{14} a 10^{15} para moléculas de rodamina 6G (R6G) adsorvidas em um sistema nanoestruturado desenvolvido especificamente para SMD.^{31,36}

Kneipp e colaboradores,³⁷ por exemplo, reportaram a obtenção do espectro de uma molécula de R6G. Nessa época surgiu o termo “*hot spots*”, ou sítios quentes, que são caracterizados pela região limite de contorno de grão entre duas nanopartículas de Ag formando um agregado. As moléculas adsorvidas nesse tipo de sítio dão origem aos sinais SERS mais intensos, tanto experimentalmente como calculados usando o modelo eletromagnético. No artigo de Kneipp e colaboradores, além da superfície SERS-ativa, os autores utilizaram radiação incidente cuja frequência, além de estar em ressonância com o SPP, era igual ou se aproximava à frequência correspondente a uma transição eletrônica da R6G. Dessa forma, obtiveram o efeito SERS ressonante, ou SERRS (*Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*). Neste caso, os autores estimaram um fator de intensificação da ordem de 10^{14} .

Apesar de a literatura reportar fatores de intensificação bem maiores que 10^6 , Le Ru e Etchegoin¹² destacam que muitos desses fatores de intensificação foram superestimados e mostram que a detecção de sinal SERS em nível de uma única molécula pode ser feita mesmo para fatores de intensificação da ordem de 10^6 .

Conforme esquematizado na Fig. 6, experimentalmente, observa-se que a intensificação SERS total é obtida não apenas via um dos mecanismos, ME ou MQ, mas pela interação dos dois mecanismos no qual um dos dois poderá ter maior contribuição que o outro. Assim, o fator de intensificação total é dado pelo produto dos dois fatores de intensificação, como mostra a Eq.(14):

$$F_{IT} = F_{ME} \times F_{MQ} \quad (14)$$

onde, F_{IT} é o fator de intensificação total, F_{ME} o fator de intensificação via mecanismo eletromagnético e F_{MQ} o fator de intensificação via mecanismo químico.

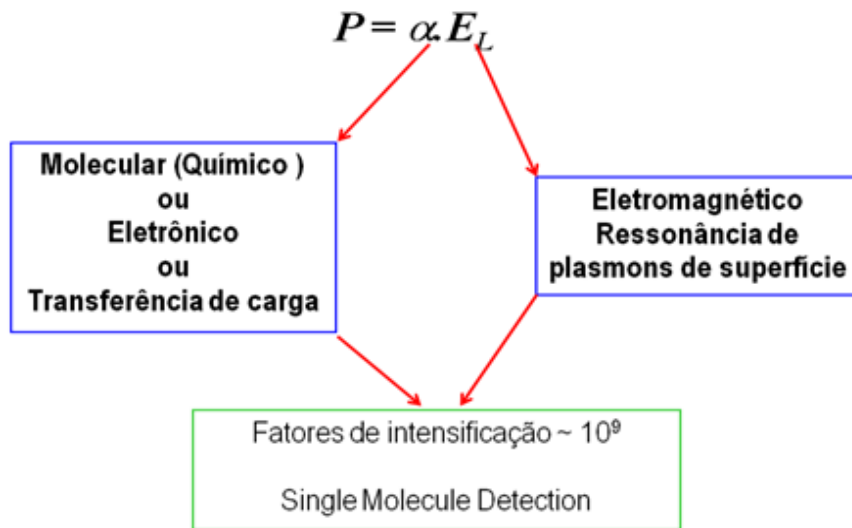


Figura 6: Representação esquemática dos mecanismos de intensificação do efeito SERS, cuja expressão ($P = \alpha \cdot E_L$) representa a relação de cada mecanismo com o momento de dipolo induzido P . Adaptado da Ref. [36].

Visto que a intensificação SERS é provocada pelos dois mecanismos combinados, esta pode ser expressa por:³⁶

$$I_{SERS}(v_s) = N' \sigma_{ads}^R |A(v_L)|^2 |A(v_s)|^2 I(v_L) \quad (15)$$

onde, $A(v_L)$ representa o fator de intensificação devido à radiação laser (contribuição do ME), de intensidade $I(v_L)$, $A(v_s)$ a radiação espalhada, o termo σ_{ads}^R representa o aumento da seção de choque Raman das moléculas em contato com a superfície nanoestruturada (contribuição do MQ) e N' é o número de moléculas envolvidas no processo.

2.2.4 “Hot Spots”

O termo “hot spots” foi usado pela primeira vez em 1999, num artigo de Shalaev et al.³⁸ Nesse artigo, os pesquisadores realizaram medidas de microscopia óptica de varredura de campo próximo (Scanning Near-Field Optical Microscopy – SNOM) em nanopartículas de ouro formando agregados com orientação randômica(fractais) sobre um substrato de vidro. Esses autores observaram a excitação de plasmons de superfície localizados (LSPR – localized surface plasmon resonances), gerando campos elétricos gigantescos em sítios específicos da superfície que foram denominados como “hot spots”. Mais tarde, em 2000, Brus e col.³⁹, estudando o efeito SERS de R6G adsorvida em

pequenos agregados de AgNPs, propuseram que “hot spots” para SERS seriam as regiões de junção entre duas AgNPs.

A seguir, serão apresentados alguns resultados publicados na literatura que, pode-se dizer, são experimentos chaves na demonstração da existência dos “hot spots” bem como de sua localização em superfícies SERS-ativas. Inicialmente, será citado o trabalho de Svedberg e col.⁴⁰ Nesse artigo, os autores fizeram uso de “pinças ópticas” para mover nanopartículas individuais de prata até o ponto de se tocarem uma a outra, formando um dímero de nanopartículas de prata isolado. Os resultados mostram que o sinal SERS do tiofenol adsorvido nas nanopartículas formando o dímero é ca. 20 vezes mais intenso que o observado para uma única partícula.

Outro trabalho com desenho experimental muito interessante envolve a síntese de nanocubos de prata e de técnicas de manipulação para gerar nanocubos isolados e formando pares. Nesse trabalho, Camargo e col.⁴¹ conseguiram obter nanocubos de prata com aresta de 100 nm cada. Os espectros SERS do 1,4-benzenoditiol (1,4-BDT) adsorvido num nanocubo de prata isolado e num dímero de nanocubos são mostrados na Fig. 7. O primeiro resultado interessante desse trabalho a ser destacado é a dependência da intensidade SERS com orientação do nanocubo em relação à polarização da radiação excitante e, em segundo lugar, o fato de que a intensidade SERS das moléculas de 1,4-BDT adsorvidas na junção entre os dois nanocubos com o laser com polarização paralela ao eixo principal do dímero (Fig.7(d)) ser ca. 170 vezes mais intenso que o sinal SERS observado para o nanocubo isolado (Fig.7(a)).

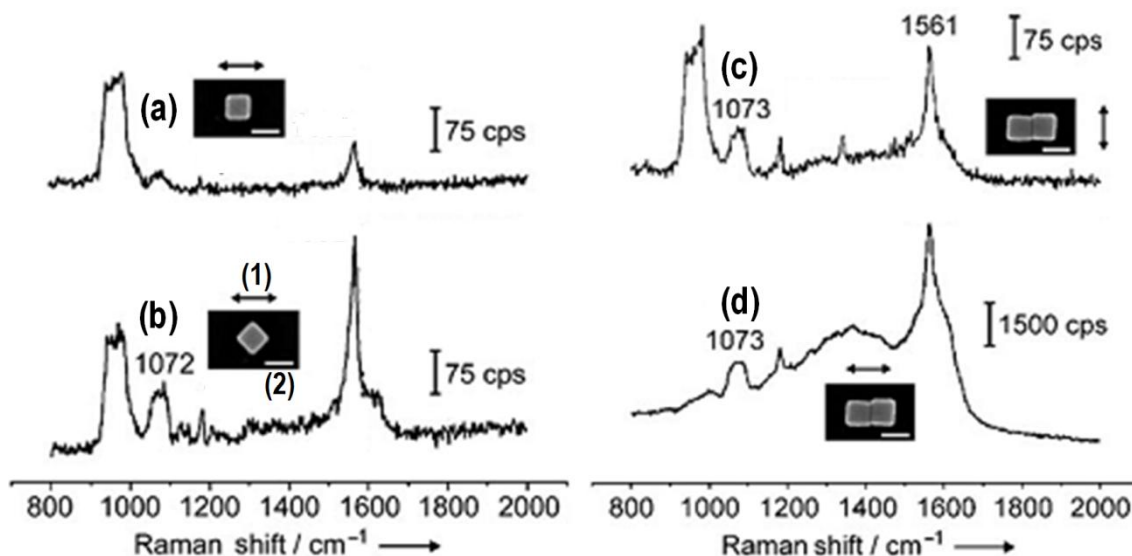


Figura 7: Espectros SERS (excitação em 514.5 nm) do 1,4-BDT: (a,b) adsorvido num nanocubo de prata para duas orientações diferentes de polarização do laser em relação ao nanocubo; (c,d) adsorvido num dímero de nanocubos, para duas orientações diferentes de polarização do laser. As inserções são imagens MET, onde (1) indica a direção de polarização do laser em relação ao nanocristal e (2) a barra dimensional equivalente a 100 nm. Adaptado da Ref. [41].

Surgiram também trabalhos teóricos, com suporte experimental, para cálculo dos fatores de intensificação, realizados por Van Duyne e col.⁴², cujos resultados mostram que os maiores fatores de intensificação são obtidos para moléculas adsorvidas na região de fronteira (junção) entre as nanopartículas. Esses autores realizaram cálculos, medidas SERS e MET para mais de 60 substratos SERS-ativos (chamados pelos autores de nanoantenas) baseados em monômeros, dímeros e trímeros de nanopartículas de ouro modificadas superficialmente pela adsorção de 2-(4-piridil)-2-ciano-1-(4-etilfenil)etileno (PCEPE). Para os monômeros, não foi observado sinal SERS do PCEPE, o que era condizente com o fator de intensificação (FI) calculado menor que 10^4 . Para 91% dos dímeros e agregados maiores foi observado sinal SERS do PCEPE, compatíveis com os FIs calculados da ordem de 10^8 . Outro aspecto a destacar desse trabalho é o deslocamento do LSPR quando se vai de dímeros para trímeros. Por exemplo, na Fig.8 (b) o dímero apresenta LSPR com máximo em 635 nm, enquanto o trímero da Fig.8(c) as LSPR apresentam um máximo de excitação em 742 nm. Além disso, os autores mostraram existir uma dependência do FI observado com a distância entre as nanopartículas em que o aumento da distância entre as NPs causa uma diminuição do FI.

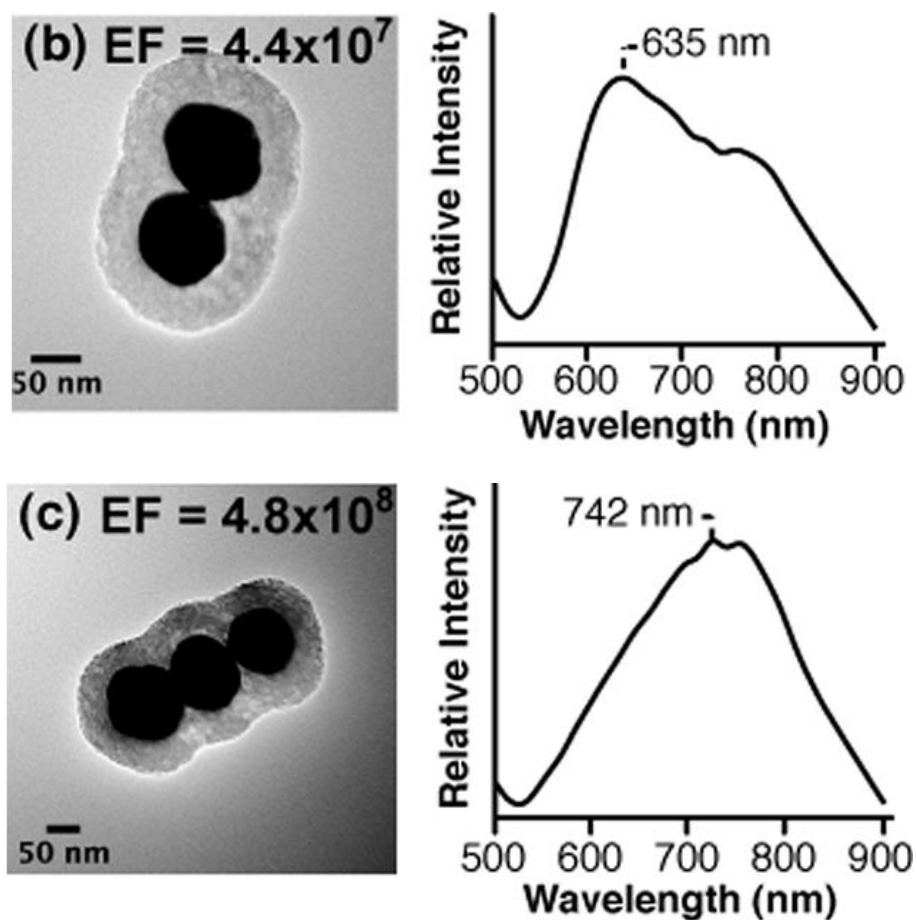


Figura 8: Micrografias MET de dois tipos de agregados de nanopartículas de Au (a esquerda) e os espectros de absorção dos LSPR correspondentes. Adaptado da Ref. [42].

Essa variação do máximo de absorção das LSPR com o tipo de agregado de NPs tem reflexos interessantes nos experimentos SERS, em especial quando se trabalha em regime de uma molécula (single molecule detection – SMD). Tomemos como exemplo, a Fig.9, onde são mostrados dois tipos hipotéticos de agregados de AgNPs, um na forma de dímero e outro na forma de um trímero linear, com os espectros de absorção correspondentes das LSPR e espectros SERS de um adsorbato hipotético. Os LSPR do dímero apresentam máximo de absorção em λ_a enquanto os LSPR do trímero apresentam um máximo em λ_b . O fator de intensificação é proporcional ao produto $|E_s|^2 \times |E_{loc}|^2$, onde E_s é o campo elétrico da radiação espalhada e E_{loc} é o campo elétrico local devido à excitação da LSPR. Assim, no caso do dímero, o modo vibracional $\nu_1(E_{S1})$ do adsorbato está em ressonância com o LSPR em λ_a , enquanto que no caso do trímero, o modo $\nu_2(E_{S2})$ está em ressonância com o LSPR em λ_b . Portanto, em regime de SMD, as intensidades relativas podem mudar, dependendo do tipo de agregado em que se encontra a molécula adsorvida.⁴²

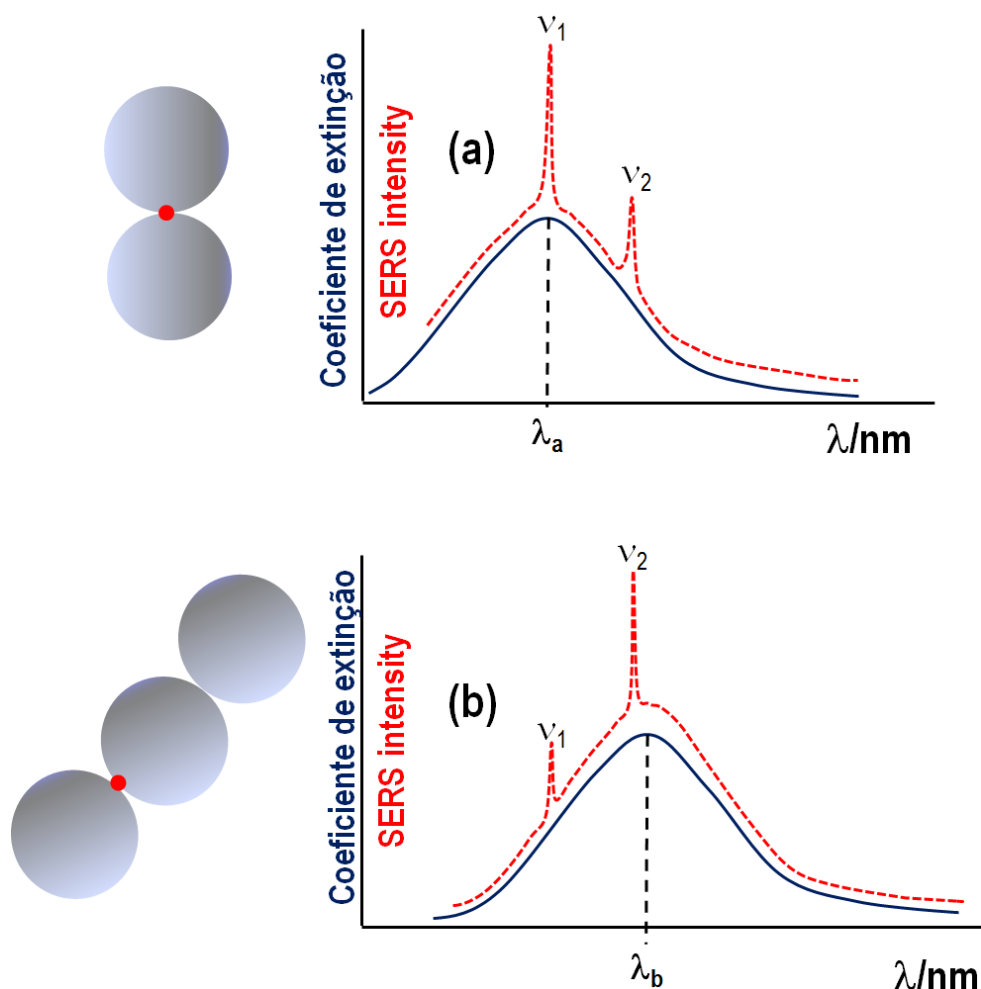


Figura 9: Espectros SERS (em vermelho) e de absorção (em azul) de para uma molécula hipotética adsorvida em dois tipos de agregados de AgNPs em regime de SMD. Ver texto para mais detalhes. Adaptado da Ref. [42].

Existem diversos trabalhos na literatura em que medidas SERS realizadas em condições de SMD mostram variações significativas nas intensidades relativas. Por exemplo, num estudo SERRS da adsorção do corante perileno em filmes de Ag depositado a vácuo, Rubim e Aroca mostram variações significativas nas intensidades relativas dos modos fundamentais do perileno e suas harmônicas.⁴³ Nesse artigo foram observados espectros SERRS onde as primeiras harmônicas apresentam intensidade comparável às fundamentais e espectros onde a segunda harmônica apresenta intensidade comparável à primeira harmônica.

Dos Santos e col.⁴⁴ realizaram um estudo SERRS em regime de SMD usando a técnica de bianalito. No caso, foram escolhidos os corantes *brilliant Green* e cristal violeta e eletrodo de Ag como substrato SERS-ativo. Nesse trabalho, os autores observaram variações significativas em intensidades relativas do lado Stokes em relação ao lado anti-Stokes (ver Fig.10).

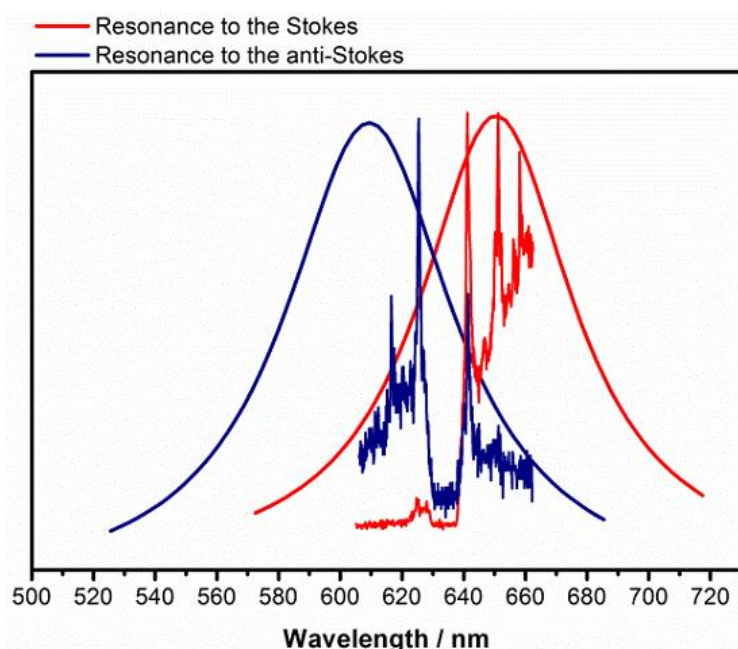


Figura 10: Representação esquemática da contribuição ressonante para os ramos anti-Stokes e Stokes do espalhamento Raman. As linhas de ressonância azul e vermelha representam transições idealísticas e os dois espectros Raman mostram duas medidas experimentais em regime de uma molécula (SMD). Em azul, o lado anti-Stokes está dentro do perfil de ressonância justificando a maior intensificação do lado anti-Stokes do espectro SERRS, enquanto em vermelho, o lado Stokes está em ressonância e, portanto, existe uma intensificação preferencial para o ramo Stokes em comparação com o anti-Stokes. Adaptado da Ref. [44]

Como será mostrado mais adiante, variações significativas nas intensidades relativas de sinais SERS das espécies investigadas neste trabalho também foram observadas e serão discutidas oportunamente.

2.2.5 Algumas Aplicações do Efeito SERS

O efeito SERS tem sido explorado principalmente nas áreas química, biológica e médica, sendo utilizado no diagnóstico de câncer,⁴⁵ controle de qualidade de diesel,⁴⁶ detecção de vestígios do pigmento verde malaquita,⁴⁷ vitamina E,⁴⁸ indícios moleculares de vida em pedras e sedimentos,⁴⁹ quantificação intracelular de derivado dinitrofenólico,⁵⁰ estudo de biorredução de cromato em *shewanella oneidensis*,⁵¹ detecção de corantes em água,⁵² poluentes como hidrocarbonetos poliaromáticos em combustíveis, água e solos,⁵³⁻⁵⁶ pesticidas em água,⁵⁷ diagnóstico de câncer de tireóide,⁵⁸ quantificação de resíduos de melanina e glúten,⁵⁹ trifenilmetano em músculo de peixe,⁶⁰ cocaína em saliva,⁶¹ hemoglobina,^{62,63} estudos eletroquímicos com o inibidor de corrosão benzotriazol (BTAH) adsorvido em eletrodos de cobre^{36,64} e detecção do BTAH utilizando sols de AgNPs.⁶⁵

Trabalhos no âmbito da detecção em nível de uma molécula (SMD) têm sido reportados, por exemplo, a detecção de uma única base do DNA,^{37,66,67} hemoglobina,⁶⁸ viral,⁶⁹ de corantes, como por exemplo, cianina,⁷⁰ R6G,⁷¹ cristal violeta,^{6,72,73} entre outras espécies.

A busca por maior estabilidade e possibilidade de identificação de moléculas em baixas concentrações resultou na utilização de matrizes poliméricas na fabricação de substratos SERS-ativos, devido à possibilidade de controle reacional. De acordo com o tamanho de partícula desejado, polímeros mais densos ou polímeros que formam géis altamente porosos podem ser utilizados. Neste sentido, o agar-agar, agar ou agarose, tem sido empregado com sucesso devido a suas características físico-químicas, ao baixo custo, ausência de toxicidade, facilidade de manuseio e, principalmente, por não ser agressivo ao meio ambiente.^{16,17}

2.3 Agar, agar-agar ou agarose

2.3.1 Estrutura e Propriedades

O agar é um hidrocolóide muito antigo, descoberto por volta do século XVII, extraído de algas marinhas, de grande importância para as áreas alimentícia, química e biológica. Devido a sua incapacidade de ser digerido por grande parte dos microrganismos, o agar é muito utilizado como meio sólido de cultura microbiológica.⁷⁴ Contudo, em virtude de sua capacidade geleificante, elevada força de gel (quando em baixas temperaturas), baixa viscosidade em solução, alta transparência, temperatura de fusão/geleificação bem definidas e termo-reversibilidade do gel, o agar tornou-se um

produto muito empregado, também, nas áreas química e biológica, sendo utilizado, por exemplo, em eletroforese, cromatografia e microextração.^{17,74}

Pode ser extraído de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas, conhecidas também como agarófitas, pertencentes à classe *Rhodophyta*, onde o agar ocorre como carboidrato estrutural das paredes celulares. As principais espécies das quais o agar é extraído são as do gênero *Gracilária*, *Gelidium*, *Pterocladia*, *Ahnfeltia*, *Acanthopheltis japonica*, *Ceramium hypnaeoides* e *C. boydenii*, cuja qualidade varia entre as espécies.^{74,75}

O agar-agar, em seu estado natural, é uma mistura heterogênea de dois polissacarídeos, a agarose (um polímero neutro) e a agarpectina (um polímero sulfatado), entretanto, apenas a agarose tem propriedade geleificante. A agarose é formada por cadeias repetidas de unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose. Já a agarpectina é a agarose com porções que variam de 3 a 10% de sulfato, advindo de éster sulfato, ácido D-glucurônico e pequenas quantidades de ácido pirúvico, sendo as porcentagens de agarose e agarpectina dependentes da espécie de alga da qual o agar foi extraído. Geralmente a agarose (Fig. 11) é responsável por aproximadamente 70% do agar.^{74,75}

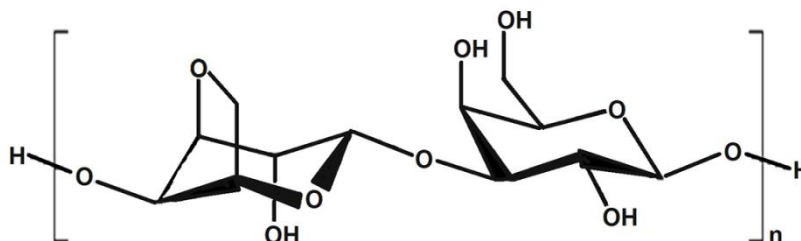


Figura 11: Estrutura química de um monômero de agarose, composto principal do agar-agar natural, onde n é o número de monômeros ou cadeias.

A agarose é um material quimicamente inerte e solúvel em água quente, 95° - 100° C, dando origem a um líquido coloidal que geleifica a temperaturas em torno de 35° - 40° C, e tais características têm se mostrado úteis no controle de reações químicas.^{16,74} Uma vez que a viscosidade restringe a difusão de íons no meio, é possível controlar reações químicas, tanto termodinâmica, quanto cineticamente. Sendo assim, a utilização da agarose como matriz polimérica abre portas para o desenvolvimento de materiais nanoestruturados novos e mais complexos, pois tal matriz permite, também, o controle do crescimento e agregação das partículas.¹⁶ Em adição, o processo de secagem do gel formado pela agarose causa o encolhimento do mesmo e promove, no caso de nanopartículas de prata dispersas no gel, além de estabilidade, a formação de “hot spots” dinâmicos, resultando na geração de um alto campo eletromagnético que melhora a intensificação do sinal Raman.^{17,18}

2.3.2 Utilização de nanopartículas dispersas em agarose

Conforme já citado na sessão 1.1, Ayyad e colaboradores¹⁶ reportaram a biorredução de prata produzindo nanopartículas com forma e tamanho controlados em meio de agarose. Neste estudo foram realizados três métodos reacionais (A, B e C), cujas concentrações e ordem de adição da agarose foram diferentes. No método A, AgNO₃ (em diversas concentrações) e agarose (3% a 5% m/v) foram aquecidos, a 90° a 95° C, por 5 min e depois a mistura foi resfriada a temperatura ambiente. No método B, o gel de agarose (6%) foi preparado separadamente e depois agitado, ainda quente, por 40 segundos com soluções de AgNO₃. No método C o gel de agarose foi preparado e resfriado separadamente, seguido de imersão dos géis em soluções de AgNO₃ e a mistura foi mantida a 7° C por 30 dias, antes da realização das medidas. As nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas apresentam diâmetros que variaram de 8 a 15 nm, sendo o maior diâmetro obtido pelo método A, utilizando solução de AgNO₃ 0,5 M e o menor diâmetro foi obtido pelo método B, utilizando solução de AgNO₃ 0,55 M. Os espectros de absorção no UV-Vis revelaram excitação dos SPPs entre 423 e 433 nm. Apesar de os autores não realizarem medidas SERS, o estudo evidencia o efeito da matriz polimérica, formada pela agarose, no controle do tamanho das AgNPs, uma vez que misturas de diversas colorações e tamanhos de partículas foram obtidas.

Lofrumento e colaboradores¹⁷ prepararam AgNPs, com diâmetro médio de 40 nm, pelo método de Lee-Meisel (redução de AgNO₃ com citrato de sódio), de forma que 2,0 g de agarose foram adicionados a 100 mL de colóide e aquecidos em microondas (300 W), seguido de resfriamento à temperatura ambiente e acondicionamento em placa de Petri. Os géis obtidos foram utilizados para extrair corantes vermelhos em amostras de tecidos para posterior identificação por espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS), onde pedaços do gel com dimensões 4 x 4 x 4 mm³ foram colocados em contato com o tecido por 30 minutos. As medidas SERS, dos géis secos, foram realizadas com radiação laser de 514,5 nm e 785 nm, com tempo de integração de 10 segundos, onde foi possível identificar a presença dos corantes alizarina, purpurina e ácido carmínico.

Saha e colaboradores¹⁸ utilizaram discos de agarose contendo AgNPs na análise de corantes (R6G, cristal violeta e alizarina) de tintas presentes em papel. As AgNPs foram preparadas, separadamente da agarose, por redução química, a quente, com citrato de sódio e dodecilssulfato de sódio. Posteriormente, uma alíquota da solução coloidal foi utilizada para solubilizar a agarose. Discos de aproximadamente 3 mm desse gel foram cortados e secos antes de serem analisados. As medidas SERS foram realizadas utilizando radiação laser de 514,5 nm e 785 nm. Medidas SERS utilizando os discos de AgNPs dispersas em agarose forneceram espectros Raman melhores, quando comparadas a medidas utilizando apenas o colóide de prata. Neste sentido, os discos de Ag-agarose tiveram melhores desempenhos devido à melhor obtenção dos espectros Raman, maior estabilidade e durabilidade desses discos, uma vez que podem ser guardados por meses e depois serem analisados novamente.

Os mesmos autores,⁷⁶ em outro estudo, utilizaram géis de agarose contendo AgNPs suportadas em tiras de papel de filtro para a realização de detecção ultra-traço de corante, pesticida e explosivo. Os géis, 3% (m/v) foram obtidos pela dissolução de agarose em solução de Ag^+ a 80° C. Tiras de 2 cm x 2 cm de papel de filtro foram mergulhadas no gel por 5 segundos e deixadas secar na ausência de luz, à temperatura ambiente, por 72 horas, de forma que ao fim desse período foi reportada a redução da prata, uma vez que o gel passou da coloração amarelo claro para marrom. As medidas SERS de TNT, cristal violeta e clorpirifos foram obtidas com excitação em 514,5 nm (para o TNT) e 785 nm (para o cristal violeta e clorpirifos). Ótimos limites de detecção foram relatados, utilizando esse substrato SERS-ativo, sendo eles da ordem de 10^{-11} M, 10^{-8} M e 10^{-9} M para o cristal violeta, TNT e clorpirifos, respectivamente.

Devido às propriedades físico-químicas, baixo custo e formação de uma excelente armadilha molecular, a agarose vem sendo cada vez mais empregada em estudos para o desenvolvimento de novos substratos SERS-ativos. Neste sentido, além de seu uso em produtos alimentícios e em meios de cultura microbiológica, a agarose tem sido utilizada, como matriz polimérica de nanocompósitos, no controle do tamanho e forma de AgNPs,^{16,77} bem como em estudos via efeito SERS de trans-1,2-bis-(4-piridil) etileno,⁷⁸ de R6G, ácido 4-aminobenzóico e 4-aminotiobenzóico,¹⁴ de 1-naftalenotiol,⁷⁹ de dicloro-difenil-tricloroetano,¹⁵ de nucleosídeos de DNA,⁸⁰ entre outras aplicações.

CAPÍTULO 3
PARTE EXPERIMENTAL

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes e Procedimentos

3.1.1 Reagentes Químicos

Os reagentes químicos, nitrato de prata (AgNO_3 – FMaia), citrato de sódio - CS ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Merck), borohidreto de sódio (NaBH_4 – Vetec), rodamina 6G – R6G ($\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$ – Sigma/ Aldrich), cristal violeta – CV ($\text{C}_{25}\text{N}_3\text{H}_{30}\text{Cl}$ – Vetec), azul de metileno – MB ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl}$ – Sigma/ Aldrich), benzotriazol – BTAH ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3$ – Sigma/ Aldrich), cloreto de sódio (NaCl – Vetec), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 35% v/v – Dinâmica), hidróxido de amônio (NH_4OH 30% v/v – Vetec), ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 96% v/v – Vetec) e agar bacteriológico (Acumedia/ Neogen) são todos de grau analítico e foram usados sem purificação prévia.

3.1.2 Procedimentos de Limpeza

Antes do uso, todas as vidrarias foram cuidadosamente limpas, inicialmente com solução “piranha” alcalina (70% v/v NH_4OH / 30% v/v H_2O_2), seguido de solução “piranha” ácida (70% v/v H_2SO_4 concentrado/ 30% v/v de H_2O_2) e a seguir enxaguadas várias vezes com água destilada, seguido de água ultrapura Milli-Q®.

3.1.3 Preparo de Soluções

As soluções padrão das espécies a serem investigadas, R6G, MB, CV e BTAH, foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ conforme indicado na Tabela 1.

As soluções, nas concentrações $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, foram obtidas pela diluição de 10 mL, da solução uma ordem de grandeza mais concentrada, para 100,0 mL. Por exemplo, para preparar a solução de R6G $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ foram tomados 10,0 mL da solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e diluídos até 100,0 mL.

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura Milli-Q®.

Tabela 1: Soluções estoques das moléculas investigadas.

Moléculas investigadas	Concentração solução estoque/mol·L ⁻¹	Alíquota da solução estoque/mL	Volume final/mL	Concentração final/mol·L ⁻¹
R6G MB CV BTAH	1,0x10 ⁻⁴	2,0	100,0	2,0x10 ⁻⁶
		4,0		4,0x10 ⁻⁶
		5,0		5,0x10 ⁻⁶
		6,0		6,0x10 ⁻⁶
		8,0		8,0x10 ⁻⁶

3.2 Síntese dos substratos SERS ativos

3.2.1 Síntese das AgNPs/Coloide

A solução de nanopartículas de prata (AgNPs/Coloide) foi preparada com base no procedimento descrito na literatura,⁸¹ conforme relatado abaixo:

Em um balão de fundo redondo, de 250 mL, em banho de gelo, foram adicionados 100 mL de solução aquosa de AgNO₃(1,4x10⁻⁴ mol·L⁻¹) e 100 mL de solução aquosa de Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (1,4x10⁻⁴ mol·L⁻¹), ambas previamente resfriadas. Em seguida, após um curto período em agitação magnética, 4mL de NaBH₄(2,5x10⁻⁴ mol·L⁻¹) foram cuidadosamente adicionados, gota a gota. A mistura permaneceu sob agitação magnética, na ausência de luz, por 2 horas, fornecendo uma solução amarela, Fig.12, que foi acondicionada em um refrigerador.



Figura 12: Imagem do produto final da síntese de AgNPs/Coloide com adição de 14 μL de solução de NaCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.2.2 Síntese das AgNPs/Agar

As nanopartículas de prata dispersas em gel de agarose (AgNPs/Agar) foram preparadas com base no procedimento descrito na literatura,⁸² porém com algumas modificações, conforme descrito a seguir. Sendo assim, diversas reações foram realizadas, conforme descrito abaixo, de forma que os parâmetros foram modificados, um a um, até a otimização da reação. As reações foram acompanhadas por espectroscopia Raman, para avaliar a redução da prata, a partir da presença do estiramento Ag-Cl assinalado em aproximadamente 242 cm^{-1} .

Procedimento A – Redução de Ag^+ com Agar

Inicialmente, com o objetivo de avaliar o efeito da agarose sobre a prata, em um erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de solução de AgNO_3 ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), previamente aquecida ($85 - 90^\circ \text{ C}$), adicionou-se 250 mg de agarose deixou sob agitação e aquecimento por 30 minutos. Ao final da reação a solução, inicialmente incolor, porém levemente turva devido à presença da agarose, passou a ter coloração amarela indicando, possivelmente, a redução da prata. A seguir os filmes foram preparados, como descrito na seção 3.2, e medidas Raman foram feitas, entretanto houve ausência do pico referente ao estiramento Ag-Cl.

Procedimento B – Redução de Ag^+ com Agar na presença de NaCl

Procedimento B-1

Em um erlenmeyer de 125 mL, 250 mg de agar foram adicionados a 10 mL de AgNO_3 ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), previamente aquecido a $85 - 90^\circ \text{ C}$ durante 5 minutos, e deixou sob agitação magnética e aquecimento por 10 minutos. Em seguida, 10,5 mL de NaCl ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram adicionados gota a gota (1 gota/s aproximadamente) com o auxílio de uma bureta, e então mais 250 mg de agar foi adicionado e a mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento por 30 minutos.

Procedimento B-2

Em um erlenmeyer de 125 mL, 250 mg de agar foram adicionados a 10 mL de NaCl ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), previamente aquecido a $85 - 90^\circ \text{ C}$ durante 5 minutos, e deixou sob agitação magnética e aquecimento por 10 minutos. Em seguida, 10,5 mL de AgNO_3 ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram adicionados gota a gota (1 gota/s aproximadamente) com o auxílio de uma bureta, e então mais 250 mg de agar foi adicionado e a mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento por 30 minutos.

Procedimento C – Redução de Ag^+ , em agar, com citrato de sódio

Procedimento C-1

Em um erlenmeyer de 125 mL, 250 mg de agar foram adicionados a 10 mL de AgNO_3 ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), previamente aquecido a $85 - 90^\circ \text{ C}$ durante 5 minutos, e deixou sob agitação magnética e aquecimento por 10 minutos. Em seguida, 10,5 mL de NaCl ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram adicionados gota a gota (1 gota/s aproximadamente) com o auxílio de uma bureta, e então mais 250 mg de agar e 3 mL de CS ($0,01423 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram adicionados e a mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento por 30 minutos.

Procedimento C-2

Em um erlenmeyer de 125 mL, 250 mg de agar foram adicionados a 10 mL de AgNO_3 ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), previamente aquecido a $85 - 90^\circ \text{ C}$ durante 5 minutos, e deixou sob agitação magnética e aquecimento por 10 minutos. Em seguida, 10,5 mL de solução de NaCl e CS ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,0467 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) foram adicionados gota a gota (1 gota/s aproximadamente) com o auxílio de uma bureta, e então mais 250 mg de agar foi adicionado e a mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento por 30 minutos.

Procedimento C-3

Em um erlenmeyer de 125 mL, 250 mg de agar foram adicionados a 10 mL de AgNO_3 ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), previamente aquecido a $85 - 90^\circ \text{ C}$ durante 5 minutos, e deixou sob agitação magnética e

aquecimento por 10 minutos. Em seguida, 5 mL de solução de NaCl e CS ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,0854 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) foram adicionados gota a gota (1 gota/s aproximadamente) com o auxílio de uma bureta, e então mais 250 mg de agar foi adicionado e a mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento por 30 minutos.

Apenas o procedimento C-3 forneceu AgNPs/Agar com atividade SERS, uma vez que os seus espectros Raman apresentaram melhores relações sinal/ruído em relação ao pico em ca. 242 cm^{-1} assinalado ao estiramento Ag-Cl, uma vez que íons cloreto são adicionados para induzir agregação das AgNPs. Sendo assim, este foi o procedimento utilizado para a síntese das AgNPs/Agar, fornecendo um gel com de coloração castanha (Fig. 13(A)) que apresentou um brilho metálico, conforme pode ser observado na Fig. 13(B) característico do espalhamento de luz pelas AgNPs presentes.

Para a formação dos filmes de AgNPs/Agar, 20 gotas da solução obtida foram depositadas por "spin coating" (1000 RPM) sobre uma lâmina de vidro durante um tempo de rotação de 15 segundos. Os filmes de AgNPs/Agar, Fig.13(C), foram guardados na ausência de luz para uso posterior.

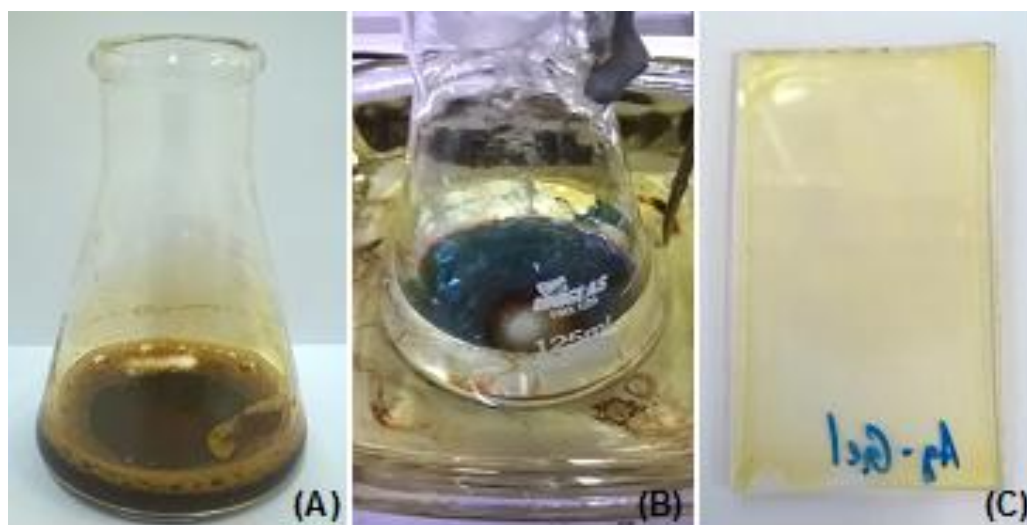


Figura 13: (A) Imagem do produto final da síntese de AgNPs/Agar, (B) da síntese completa de AgNPs/Agar durante agitação magnética e (C) de AgNPs/Filme de Agar obtido por deposição de AgNPs/Agar por "spin coating".

É importante ressaltar que a síntese de AgNPs em gel de Agar, acima descrita, foi otimizada, e antes de sua obtenção várias outras reações foram feitas porém, resultados insatisfatórios foram obtidos. Na tentativa de obtenção de AgNPs em forma, tamanho e estado de agregação adequados para a observação do efeito SERS vários parâmetros foram alterados, um a um, até que se conseguisse o resultado desejado. A rota sintética para a obtenção do substrato SERS-ativo de AgNP/Agar será descrita com mais detalhes na sessão de resultados.

3.3.Caracterização dos Materiais

3.3.1 Instrumentação

As medidas SERS foram realizadas em um sistema Raman InVia, da Renishaw, equipado com um detector CCD, resfriado termoeletricamente e uma rede de difração de 1200 linhas/mm. Um microscópio Leica com uma objetiva de 50x foi usado para focalizar o feixe da radiação laser na amostra e coletar a radiação espalhada. A resolução espectral nominal foi 6 cm^{-1} . O laser de excitação foi o de HeNe (Renishaw) com emissão em $632,8 \text{ nm}$. Todos os espectros foram obtidos a uma potência de laser de 2 mW (medidos na entrada do instrumento, depois de um filtro de 10%). Os números de onda foram calibrados utilizando uma pastilha de Si.

Os espectros na região do UV-Vis ($200 \text{ a } 800 \text{ nm}$) foram adquiridos em um espectrofotômetro UV-Vis 2450 da Shimadzu.

As micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), das AgNPs/Coloide e AgNPs/Agar foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 da Jeol.

Na obtenção dos filmes de AgNPs/Agar foi usada a técnica de “spin coating” empregando um equipamento da SmartCoat operado a 1000 RPM , com aceleração de 2000 RPM/s e tempo de rotação de 15 segundos.

3.3.2 Medidas SERS, UV-Vis e MET com as AgNPs/Coloide

Inicialmente, para induzir agregação das nanopartículas de prata, $14 \mu\text{L}$ de solução de NaCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foram adicionados a 5 mL de AgNP/Coloide. Em um ependorf adicionou-se, a 1 mL da mistura (AgNP/Coloide/NaCl), $60 \mu\text{L}$ de solução de R6G, na concentração desejada, homogeneizou-se a mistura e adicionou-se uma alíquota da mesma em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm . Para cada solução de AgNP/Coloide/R6G foram registrados 100 espectros SERS, com tempo de integração de 1 segundo. Para cada concentração foram realizadas medidas em triplicata.

Para as medidas no UV-Vis, a solução de AgNP/Coloide/R6G foi colocada em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm . A concentração de R6G nessa solução foi de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,

Uma gota (ca. $0,025 \text{ mL}$) da solução de AgNP/Coloide, contendo NaCl ($14 \mu\text{L}$ de NaCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada 5 mL de AgNPs/Coloide) foi depositada sobre um grid de cobre, da SpiSupplies, para análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e então deixou secar de um dia para o outro, à temperatura ambiente, para posterior aquisição das micrografias.

As micrografias foram tratadas no software ImageJ, versão 1.48, para a estimativa do tamanho médio das partículas e dos histogramas, cujos dados foram trabalhados no software OriginPro 8.

3.3.3 Medidas SERS, UV-Vis e MET com as AgNPs/Agar

Os filmes de AgNPs/Agar foram recobertos com uma gota, contendo 60 µL de solução do adsorbato (R6G, MB, CV ou BTAH), na concentração desejada por 18 horas à temperatura ambiente antes de realizar as medidas SERS. Para cada filme foram adquiridos 100 espectros SERS, usando o procedimento de “mapping” do equipamento Renishaw. Os 100 espectros, com tempo de integração de 1 segundo, foram adquiridos em intervalos de 2µm, resultando em uma área varrida de 20 x 20 µm. As medidas para cada solução foram realizadas em triplicata.

Para as medidas no UV-Vis, os filmes de AgNPs/Agar foram cobertos com 1 mL da solução do adsorbato, em concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As medidas foram realizadas após 18 hs de exposição do filme à solução contendo o adsorbato.

Para a obtenção das micrografias por MET o gel de AgNPs/Agar foi diluído, com água ultrapura Milli-Q[®] quente (aproximadamente 80 - 90 °C), na proporção de 1:50. Uma gota dessa solução (ca. 0,025 mL) foi adicionada sobre o grid de cobre que foi acondicionado em recipiente apropriado à temperatura ambiente por 18 h antes de realizar as medidas. As micrografias foram tratadas no software ImageJ, versão 1.48, para a estimativa do tamanho médio das partículas e geração dos histogramas, cujos dados foram tratados no software OriginPro 8.

CAPÍTULO 4
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AgNPs/Coloide como substrato SERS-ativo

4.1.1 Síntese e caracterização das AgNPs/Coloide

As amostras de AgNPs/Coloide foram preparadas conforme descrito na seção 3.2, fornecendo uma solução de coloração amarela (Fig.12) que, após a adição de 14 μL de solução de NaCl ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a 5 mL de solução coloidal, ficou ligeiramente mais escura, acompanhada de um leve aumento em sua viscosidade e turbidez, indicando agregação das nanopartículas, devido à adsorção de íons Cl^- na superfície das partículas.

A solução coloidal foi então caracterizada quanto ao tamanho e forma das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível. As Figs. 14(a), (b), e (c) mostram as micrografias e o histograma, construído a partir da medida de 300 nanopartículas. As micrografias mostram que as nanopartículas de Ag (AgNPs), apresentam forma predominantemente esférica, com diâmetro médio de 8 nm. Nota-se que as AgNPs encontram-se, em sua maioria, agregadas em duas ou mais partículas.

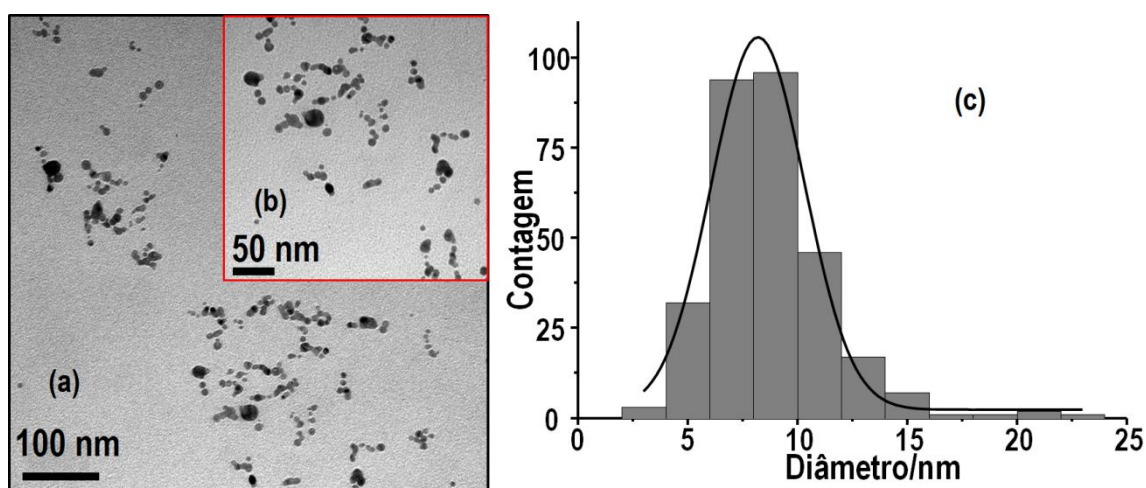


Figura 14: Micrografias das AgNPs/Coloide com aumento de 200 kV (a) e 400 kV (b) e histograma obtido pela medida de 300 partículas (c).

O espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs/Coloide é apresentado na Fig. 15 e mostra um máximo de absorção em 394 nm, característico da excitação de SPP em NPs de prata.⁸³

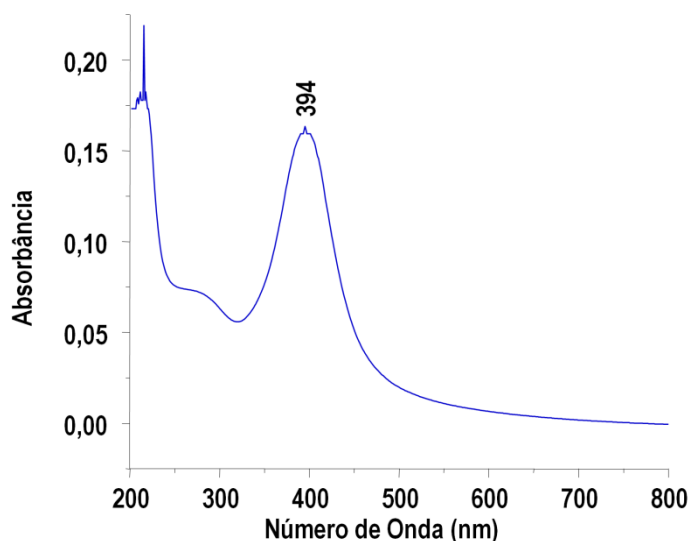


Figura 15: Espectro da absorção UV-vis da solução coloidal de AgNPs/Coloide.

Nota-se que a banda de absorção não mostra qualquer assimetria, indicando a presença de partículas de tamanho relativamente uniforme e a ausência de agregados maiores de nanopartículas, os quais causam uma assimetria dessa absorção para maiores comprimentos de onda.

4.1.2 Estimativa da concentração de AgNPs

A prata metálica cristaliza-se numa estrutura cúbica de face centrada (grupo espacial $Fm3m$), cuja célula unitária possui quatro átomos com parâmetro de célula de $4,0862 \text{ \AA}$ ou $0,40862 \text{ nm}$ levando a um volume de célula unitária, calculado, corresponde a $0,06823 \text{ nm}^3$.⁸⁴ Os 200 mL de solução usada na síntese das AgNPs contém $2,1 \times 10^{20}$ íons Ag^+ . De acordo com os dados de MET, as AgNPs apresentam um diâmetro médio de $8,0 \text{ nm}$. Supondo que todas as AgNPs possuem simetria esférica, em 200 mL de solução seriam gerados, por redução, $1,34 \times 10^{16}$ esferóides de prata, dando uma concentração de AgNPs de $1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$.

As medidas SERS foram realizadas na configuração confocal do equipamento. Nessas condições, o volume confocal amostrado pelo feixe do laser incidindo na amostra é dado por:⁸⁵

$$V_{confocal} = \pi^{\frac{3}{2}} \kappa \omega^3 \quad (16)$$

onde ω é o raio do feixe laser no plano x,y e κ é um fator geométrico definido pela razão entre a resolução óptica na direção z (direção do feixe laser) e a resolução óptica no plano x,y e pode ser dado pela expressão:

$$\kappa = \frac{2,33n}{NA} \quad (17)$$

onde n é o índice de refração e NA é a abertura numérica da objetiva. Considerando que as medidas foram realizadas em solução aquosa ($n = 1,3$), que a objetiva usada tem $NA = 0,45$ e $\omega = 2 \mu\text{m}$, temos um volume confocal de $300 \mu\text{m}^3$ ou $3 \times 10^{-10} \text{cm}^3$, valor duas vezes maior do que o obtido por Le Ru et. al.⁸⁶ para uma objetiva com características semelhantes. Portanto, o número de AgNPs amostradas pelo feixe laser nesse volume deve ser menor do que $2,0 \times 10^4$ uma vez que, como mostram os resultados de MET, parte significativa das AgNPs encontram-se formando agregados de duas ou mais partículas.

Os espectros SERS registrados das AgNPs/Coloide, Fig.16, revelam a presença de um sinal SERS em ca. 247cm^{-1} referente ao estiramento Ag-Cl, uma vez que o cloreto é adicionado antes da adição do adsorbato, para estabilizar e induzir a agregação das nanopartículas. A observação desse sinal SERS dá uma indicação da qualidade do substrato para estudos SERS. Se esse sinal não é observado, o substrato dificilmente apresentará sinal SERS significativo para espécies adsorvidas. Registre-se que nos espectros da Fig.16, as relações sinal/ruído são muito diferentes. Por exemplo, no espectro 24/100 a amplitude do sinal é aproximadamente duas vezes a amplitude do ruído, enquanto no espectro 93/100, essa relação é maior que 10 vezes.

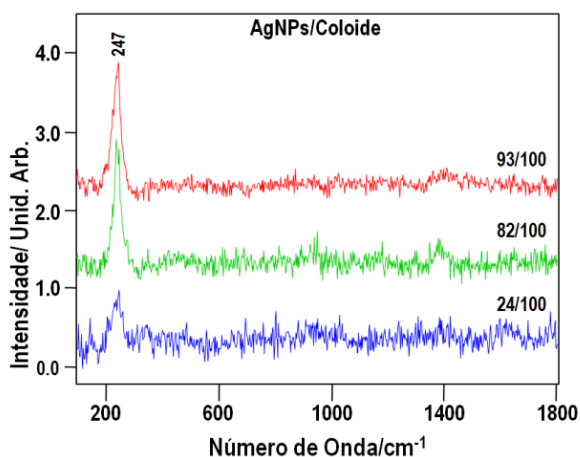


Figura 16: Espectros Raman das AgNPs/Coloide.

Uma das substâncias mais usadas para avaliar a atividade SERS de um substrato é a R6G.⁸⁷ Neste sentido, escolheu-se a R6G como molécula prova para ser usada como referência na comparação das atividades SERS dos dois substratos SERS-ativos investigados neste trabalho, os substratos a base de AgNPs/Coloide e os substratos a base de AgNPs/Agar.

4.1.3 Adsorção de Rodamina 6G (R6G) em AgNPs/Coloide

Os espectros SERS da R6G (em duas concentrações) adsorvida em amostra de AgNPs/Coloide são mostrados nas Figs.17 e 19. Como já descrito anteriormente, o pico observado em todos os espectros na faixa de $242\text{-}245\text{ cm}^{-1}$ se deve ao modo de estiramento Ag-Cl (ν_{AgCl}) referente ao cloreto adsorvido à nanopartícula metálica, uma vez que íons cloreto foram adicionados à solução coloidal para estabilizar e induzir a agregação das AgNPs. Em alguns espectros é possível observar apenas o pico em $242\text{-}245\text{ cm}^{-1}$ (ν_{AgCl}) e em outros há a presença de picos característicos do corante R6G.⁸⁷ Por exemplo, o espectro 5/100 (Fig.17(a)) mostra apenas o sinal em 245 cm^{-1} , enquanto os espectros 24/100, 48/100 e 58/100 mostram, além do sinal em 242 cm^{-1} , sinais característicos da R6G. Como a concentração de R6G é muito baixa, durante a aquisição dos espectros pode acontecer de que as AgNPs presentes no caminho do feixe de excitação laser não tenham moléculas de R6G adsorvidas, resultando na observação apenas do modo ν_{AgCl} .

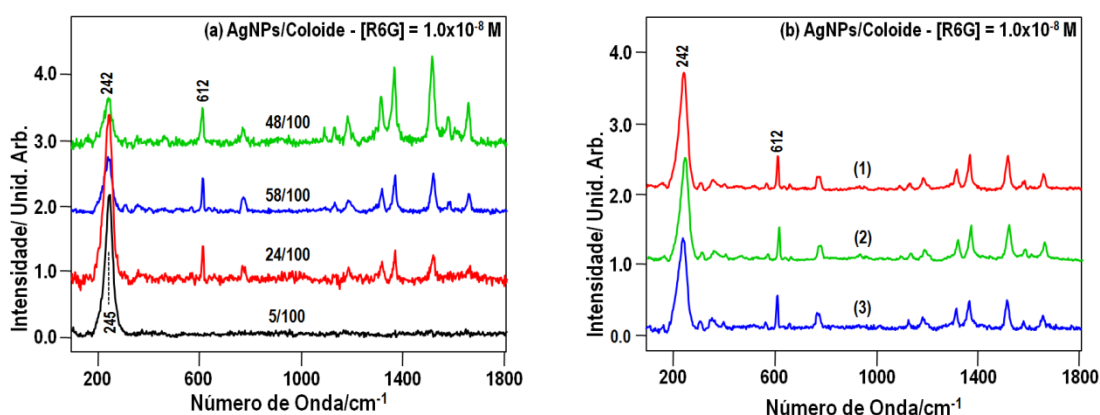


Figura 17: Espectros SERS de AgNPs/Coloide com R6G $1,0 \times 10^{-8}$ M. (a) espectros simples são indicados pelo número de um total de 100 espectros. (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.

Nos espectros da Fig.19(a) onde se observa sinais da R6G o modo ν_{AgCl} aparece deslocado para menores números de onda (232 cm^{-1}). Mais adiante apresentaremos uma explicação para esse deslocamento.

Os resultados da Fig.17(a) também mostram variações significativas nas intensidades relativas, não apenas entre os sinais da R6G e o modo ν_{AgCl} , mas também nas intensidades relativas da R6G. Por exemplo, no espectro 48/100 os sinais da R6G próximos de 1361 e 1510 cm^{-1} são mais intensos que o sinal em 612 cm^{-1} , enquanto que nos espectros 58/100 e 24/100 suas intensidades são ligeiramente semelhantes. Note que nos espectros correspondentes às médias de 100 espectros, Fig.17(b), espectros (1), (2) e (3), as intensidades relativas se mantêm constantes. As variações de intensidade relativa são observadas somente para baixas concentrações e tempos curtos de

integração do sinal.^{44,88} pois refletem as variações das ressonâncias de SPP para cada AgNP que cruza o feixe laser durante a aquisição dos espectros.

Contudo, conforme esperado,⁸⁷ em baixas concentrações, tal como $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, há um número significativo de eventos nulos para R6G, ou seja, alguns dos espectros registrados mostram apenas o sinal do Ag-Cl, como por exemplo, o espectro 5/100 da Fig.17(a). Entretanto, todos os espectros mostram o sinal SERS do Ag-Cl, com maior ou menor intensidade, evidenciando que a pouca quantidade de espectros com sinais SERS da R6G se deve à baixa concentração do adsorbato e não à ausência de nanopartículas SERS-ativas. Para melhor ilustrar esse comportamento, a Fig.18 mostra uma representação 3D dos 100 espectros que constituem uma das réplicas da Fig.17(b). Esse conjunto de espectros mostra como variam as intensidades relativas em cada espectro, bem como a existência de vários espectros onde nenhum sinal SERS da R6G é observado.

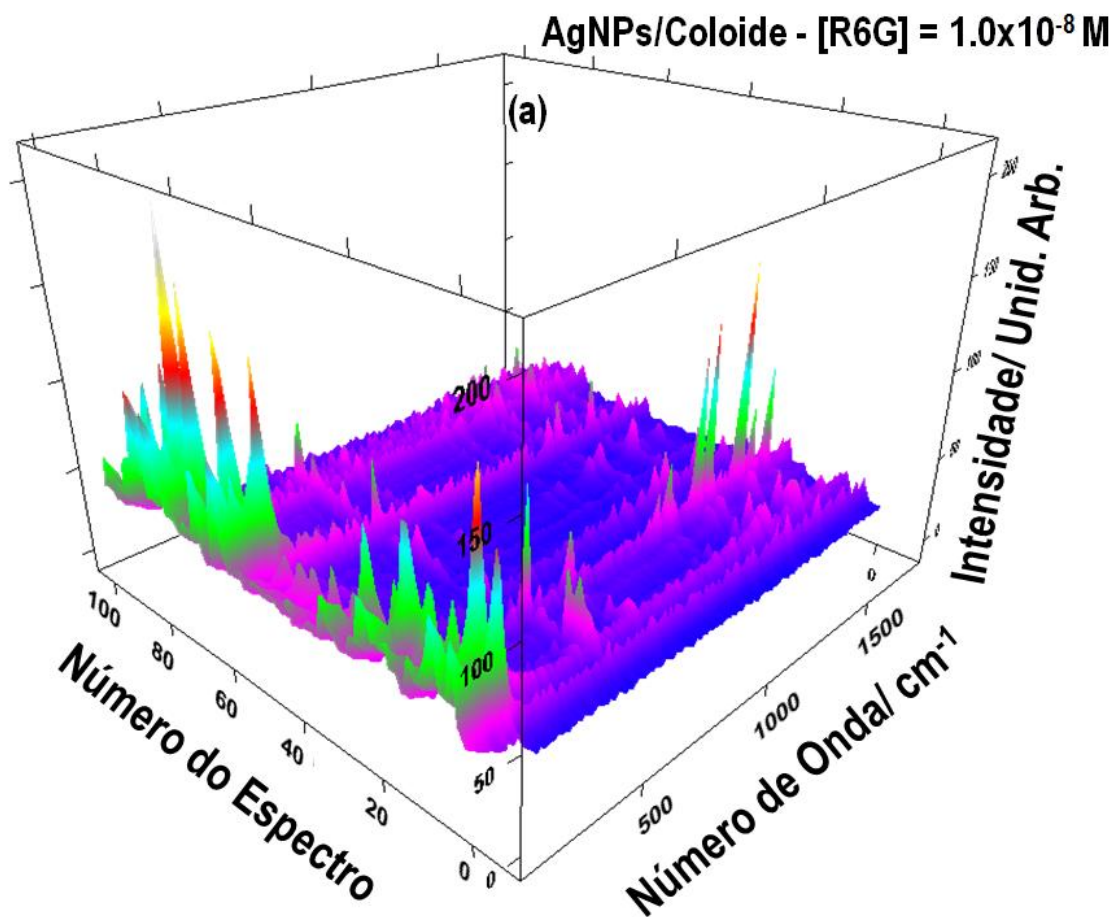


Figura 18: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados da Fig. 17(b).

Conforme mencionado na parte experimental, o volume de solução de AgNPs para essas medidas foi de 1 mL. De acordo com a estimativa da concentração de AgNPs na amostra de

AgNPs/Coloide, 1 mL dessa solução contém $6,7 \times 10^{13}$ AgNPs de simetria esférica e uma área total de $1,35 \times 10^{16}$ nm². Assumindo que a área ocupada por uma molécula de R6G adsorvida seja de 1 nm², para a cobertura completa da superfície das AgNPs no coloide seriam necessárias $1,35 \times 10^{16}$ moléculas de R6G. No presente caso, Fig.17, a concentração de R6G é 10^{-8} M, correspondendo a $3,6 \times 10^{11}$ moléculas em 60 µL da solução que foram adicionados a 1mL da solução de AgNPs. Esse número é menor que o número de AgNPs ($6,7 \times 10^{13}$), sugerindo ser muito provável a existência de AgNPs com apenas uma molécula adsorvida na superfície. Neste sentido, estes resultados sugerem que os espectros da Fig. 17(a) são devido à detecção de moléculas únicas (*SMD – single molecule detection*) de R6G adsorvidas nas AgNPs. Mais evidências para esta afirmação serão apresentadas adiante.

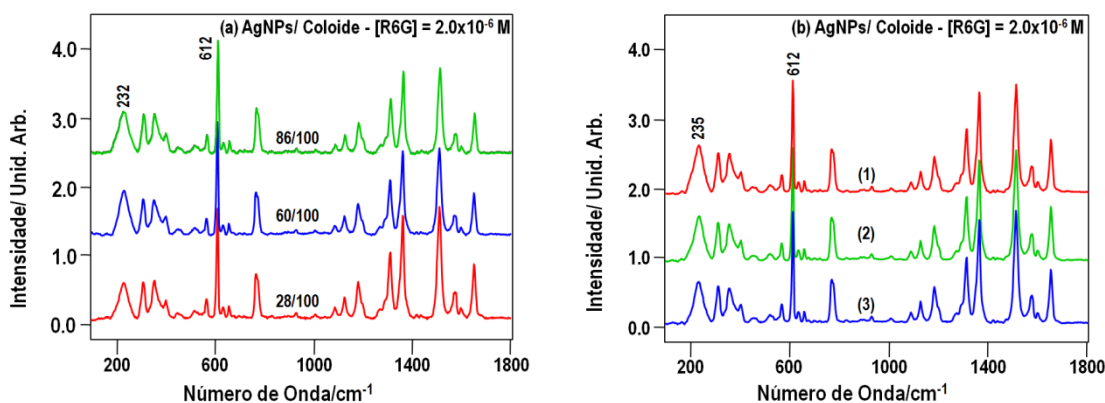


Figura 19: Espectros SERS de AgNPs/Coloide com R6G $2,0 \times 10^{-6}$ M. (a) espectros simples são indicados pelo número de um total de 100 espectros. (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas. Os espectros foram normalizados em relação às intensidades dos picos em 612 cm^{-1} .

Espectros SERS da R6G em concentração mais alta ($2,0 \times 10^{-6}$ M) na presença de AgNPs/Coloide são apresentados na Fig.19(a). Neste caso, observa-se que os espectros individuais apresentam comportamento diferente do observado para a concentração de 10^{-8} M, pois as intensidades relativas se mantêm constantes para cada espectro e são as mesmas das observadas para as médias dos 100 espectros (Fig.19(b)). Estes resultados sugerem que, nessa concentração, os sítios SERS-ativos nas superfícies das AgNPs estão completamente ocupados por moléculas de R6G.

O conjunto dos 100 espectros SERS para uma das réplicas está apresentado numa imagem 3D na Fig.20. Embora as intensidades absolutas para cada sinal SERS observado sejam diferentes de espectro para espectro, as intensidades relativas se mantêm constantes, tanto em relação aos espectros simples entre si, quanto quando estes são comparados às médias espectrais. Na Fig.19(a) os espectros aparecem com as mesmas intensidades, pois foram normalizados em relação ao sinal SERS em 612 cm^{-1} .

Os espectros SERS da Fig.19(a) mostram que o sinal do Ag-Cl aparece em 235 cm^{-1} . Como a R6G é um cátion, esta, provavelmente, se adsorve sobre as AgNPs formando um par iônico com íon Cl^- , resultando num deslocamento do modo ν_{AgCl} para números de onda menores.

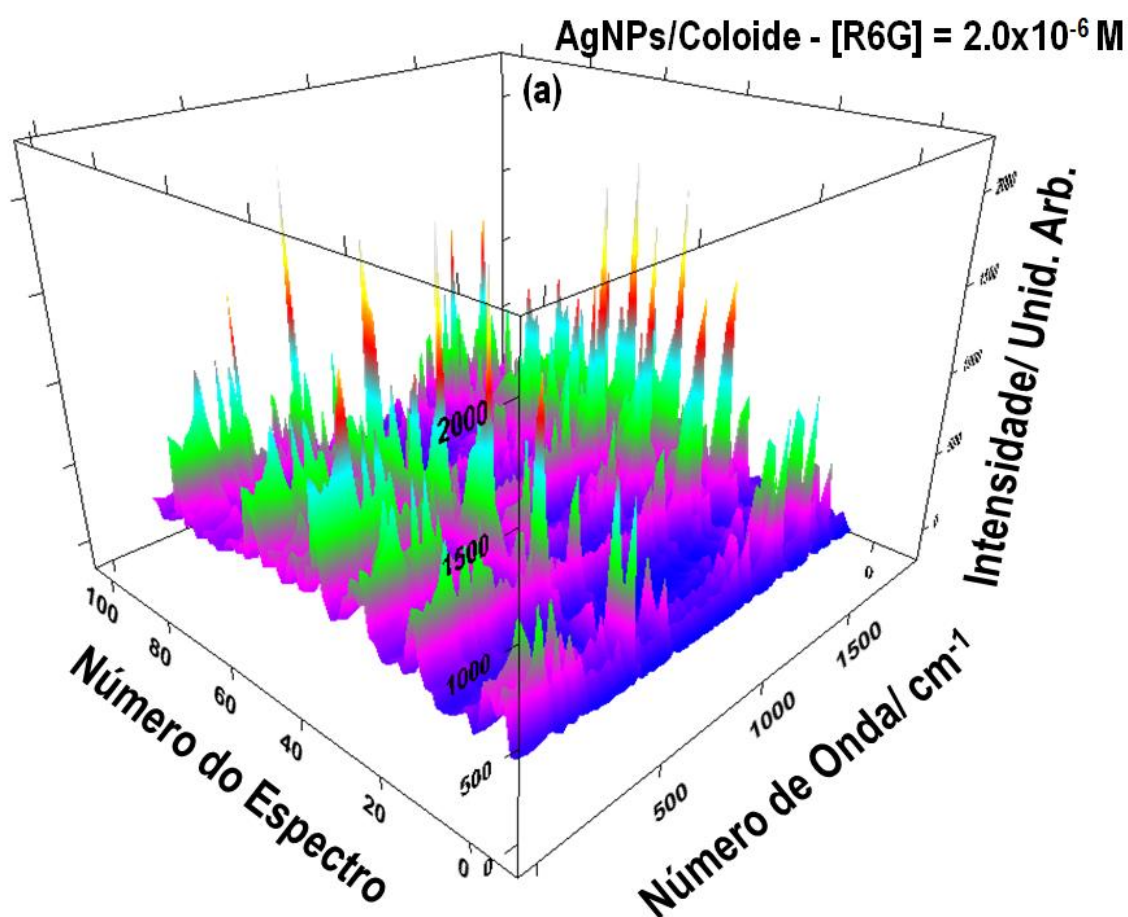


Figura 20: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 19(b).

A seguir, procurou-se investigar, com mais detalhes, a variação das intensidades SERS da R6G com sua concentração. A variação da intensidade SERS do sinal da R6G em 612 cm^{-1} em função da concentração de R6G é apresentada na Fig.21. Esses resultados mostram que a intensidade SERS do sinal da R6G em aproximadamente 612 cm^{-1} tende a um valor limite à medida que a concentração de R6G aumenta, sugerindo que para concentrações altas ocorre uma saturação dos sítios SERS-ativos. É importante ressaltar que a intensidade em cada concentração é um valor médio de medidas em triplicata, onde cada medida corresponde a uma média dos 100 espectros registrados em cada réplica.

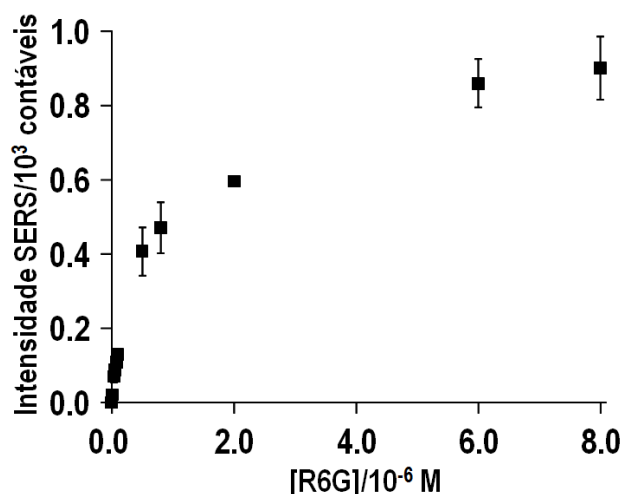


Figura 21: Dependência da intensidade SERS (a 612 cm^{-1}) na concentração da solução de R6G para a R6G adsorvida nas AgNPs/Coloide. As barras verticais correspondem ao desvio padrão da medida da intensidade média (triplicata).

Para avaliar o comportamento da adsorção da R6G nas AgNPs/Coloide diferentes modelos de isotermas de adsorção foram testados. O primeiro modelo aplicado para os dados observados foi a isoterma de Freundlich, cuja equação é expressa por:⁸⁹

$$\theta = K_F C^{1/n} \quad (18)$$

onde K_F é uma constante que não depende da concentração da R6G, C é a concentração de equilíbrio da R6G na solução e $1/n$ é um parâmetro empírico. Os valores de θ serão obtidos através da expressão:

$$\theta = \frac{I}{I_0} \quad (19)$$

onde I é a intensidade do sinal em 612 cm^{-1} de uma particular concentração de solução do adsorbato e I_0 é a intensidade SERS do sinal em 612 cm^{-1} a uma concentração definida, usualmente próxima da saturação. Neste caso I_0 foi escolhido como sendo a concentração de $8,0 \times 10^{-6}\text{ M}$.

O segundo modelo de isoterma de adsorção foi a de Langmuir, descrito por:⁹⁰

$$\theta = \frac{K_L C}{K_L C + 1} \quad (20)$$

onde K_L é a constante de adsorção de Langmuir, C e θ têm o mesmo significado como descrito acima para a Equação 18.

Outro modelo de adsorção testado foi a isoterma de adsorção de Frumkin, expressa por:^{91,92}

$$\theta = \frac{K_{Fk} C e^{-2g\theta}}{K_{Fk} C e^{-2g\theta} + 1} \quad (21)$$

onde K_{Fk} é a constante de adsorção de Frumkin e g é um parâmetro correlacionado à interação entre as espécies adsorvidas. Se $g < 0$, a interação é repulsiva, em contrapartida, se $g > 0$ a interação é atrativa.

Os três modelos de adsorção citados acima foram aplicados para a adsorção de R6G nas AgNPs/Coloide. Os dados experimentais e as curvas ajustadas para cada tipo de isoterma são apresentados na Fig. 22 e a Tabela 2 mostra os parâmetros de ajuste obtidos para cada curva.

Tabela 2: Parâmetros de ajuste para as isotermas mostradas na Fig. 22.

Superfície/ Adsorbato	Tipo de Isoterma	Equação	Outros Parâmetros	K	R ²
AgNPs/ Coloide/R6G	Freundlich	(18)	$c = 0.54 \pm 0.04$	$7.7 \times 10^2 \pm$ 0.7×10^2	0.952
	Langmuir 1	(23)	$c = 0.97 \pm 0.03$	$1.6 \times 10^6 \pm$ 0.2×10^6	0.993
	Langmuir 2	(20)		$1.4 \times 10^6 \pm$ 0.1×10^6	0.988
	Frumkin	(21)	$g = 0.8 \pm 0.2$	$5.0 \times 10^5 \pm$ 1.8×10^5	0.976

* c = coeficiente linear (inclinação da reta); g = parâmetro descrito pela isoterma de Frumkin, descrito na Equação 21.

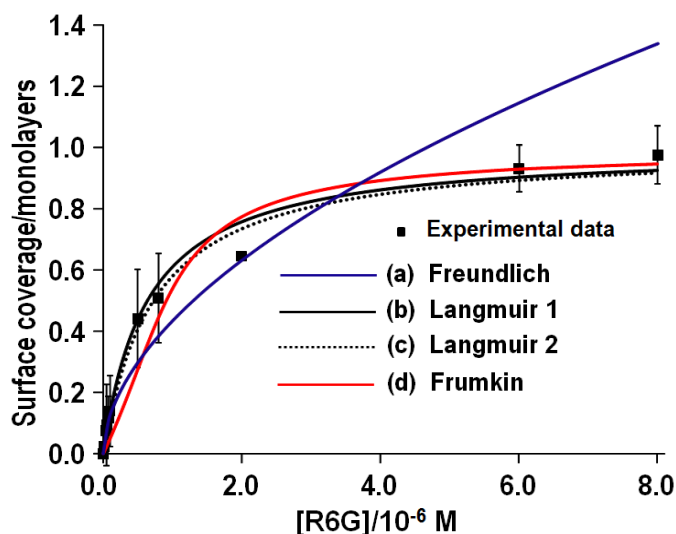


Figura 22: Recobrimento da superfície (θ) as AgNPs/Coloide como uma função da concentração de R6G. (■) Dados experimentais; e ajustes para as isotermas de: (a) Freundlich; (b) Langmuir 1; (c) Langmuir 2; (d) Frumkin.

No caso da isoterma de Freundlich os valores de θ foram obtidos usando o K_F e $1/n$ como obtidos a partir da equação abaixo:

$$\log \theta = \log K_F + \frac{1}{n} \log C \quad (22)$$

Note que a Fig. 22 mostra duas isotermas de Langmuir. A isoterma de Langmuir 1 foi obtida pela recuperação dos valores de θ usando a forma linearizada da equação de Langmuir:

$$\frac{C}{\theta} = \frac{1}{K_L} + C \quad (23)$$

A isoterma de Langmuir 2 foi obtida por dados gerados pelo ajuste dos dados experimentais à Eq. (20). Os resultados da Tabela 2 mostram que, no caso da R6G adsorvida nas AgNPs/Coloide, os melhores parâmetros de ajuste foram para as isotermas de Langmuir (1 e 2). É importante mencionar que o coeficiente linear esperado para a equação de Langmuir (Eq. 20) é um, e que o coeficiente obtido foi de 0,97 para uma $K_L = 1,6 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$. Para este valor de K_L obtém-se um valor de ΔG_{ads} de $(-35 \pm 1) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($\Delta G_{ads} = -RT \ln K_L$), indicando que a R6G adsorve quimicamente sobre a superfície das AgNPs, seguindo um mecanismo de adsorção de Langmuir. A pequena diferença entre os dois ajustes de Langmuir é devido ao fato que o coeficiente linear obtido a partir da Eq. 20 ser ligeiramente diferente da unidade.

De acordo com a isoterma de Langmuir 1 da Fig. 22, o recobrimento da superfície, θ , pela R6G na concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ M, é $0,023 \pm 0,002$. Ou seja, ca. 2,3% dos sítios SERS-ativos estão recobertos por moléculas de R6G, o que reforça a afirmação prévia de que nessa concentração de R6G em solução os espectros SERS da Fig. 17(a) são de moléculas individuais de R6G.

4.2 AgNPs/Agar como substrato SERS-ativo

4.2.1 Síntese e caracterização das AgNPs/Agar

Uma vez descritas as etapas de otimização sintética das AgNPs/Agar, estas foram preparadas de acordo com a seção 3.2, fornecendo um gel de coloração castanha com um brilho superficial metálico, conforme observado na Fig. 13(B). Os filmes obtidos foram caracterizados quanto ao tamanho e forma por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia no UV-Vis. As Figs. 23(a), (b) e (c) mostram as micrografias obtidas, assim como o histograma construído a partir da medida de 300 partículas, no qual é possível observar a formação de nanopartículas esféricas, com distribuição média de 19 nm e com agregados de duas ou mais partículas. O espectro de absorção no UV-Vis de um filme de AgNPs/Agar é apresentado na Fig. 24(b), em comparação com o espectro de absorção de uma solução de AgNPs/Coloide, Fig. 24(a). Note que no caso das AgNPs/Agar, um máximo de absorção é observado em 423 nm, ou seja, deslocado em 29 nm para maiores comprimentos de onda em relação ao máximo observado para as AgNPs/Coloide. Esse deslocamento é compatível com o aumento do tamanho médio das AgNPs. Além disso, o espectro da Fig. 24(b) mostra uma estrutura bem visível (fraca intensidade e larga) próximo a 600 nm, indicando a presença de uma maior quantidade de agregados em relação à amostra de AgNPs/Coloide.

Espectros Raman registrados das AgNPs/Agar revelaram a presença de um pico assinalado na faixa de $242\text{-}245\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento Ag-Cl, uma vez que o cloreto é adicionado à síntese como agente agregante. A presença do pico de Ag-Cl com alta intensidade é um forte indício de que o substrato é SERS-ativo. Sendo assim, foram realizadas medidas SERS avaliando a adsorção de compostos modelos nos filmes de AgNPs/Agar, de forma que 60 μL das soluções dos adsorbatos foram colocados sobre os filmes obtidos e mantidos na ausência de luz por um período de incubação de 18 horas.

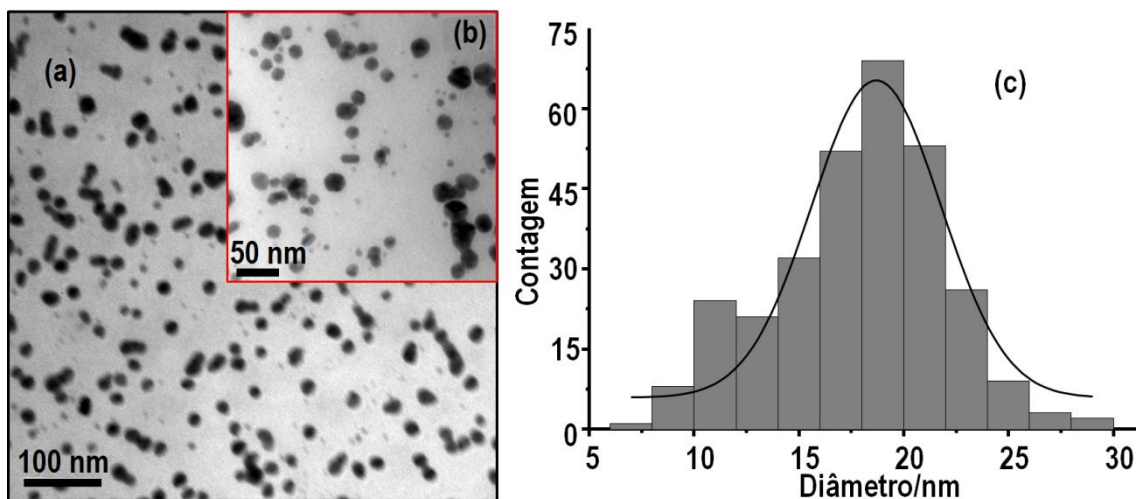


Figura 23: Micrografias das AgNPs/Agar com aumento de 200 kV (a) e 400 kV (b), histograma obtido pela medida de 300 partículas (c).

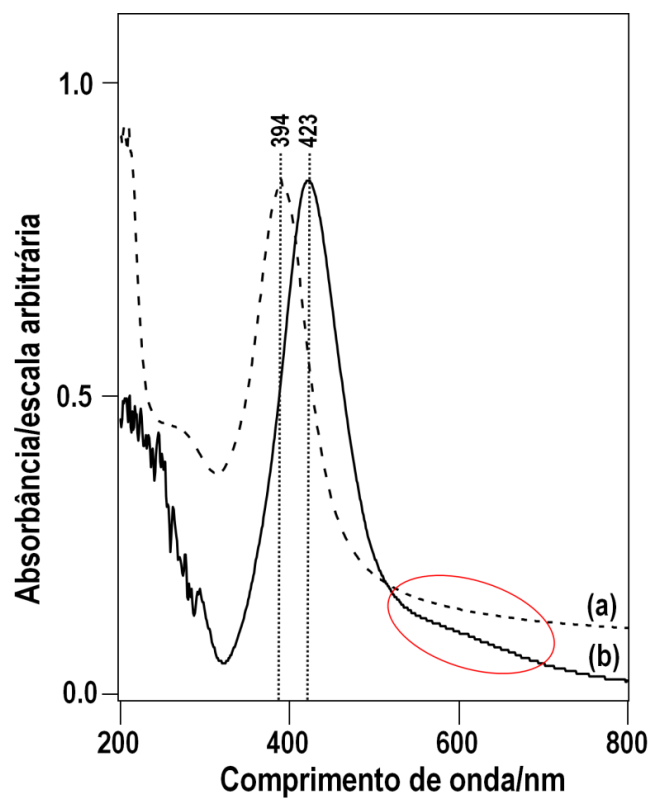


Figura 24: Espectros no UV-Vis das AgNPs/colóide (- - -) e AgNPs/Agar (____).

4.2.2 Caracterização dos adsorbatos utilizados (R6G, MB, CV e BTA)

Os compostos modelos, adsorbatos, utilizados foram escolhidos de forma a explorar a funcionalidade do substrato para diferentes fatores de intensificação, uma vez que alguns adsorbatos podem estar em ressonância com a radiação laser e, conforme visto anteriormente, um sistema em ressonância tem maior fator de intensificação e dá origem a um espectro do tipo SERRS. Considerando que os espectros foram excitados com a radiação laser em 632,8 nm, os adsorbatos utilizados foram a R6G (razoavelmente fora de ressonância), CV (pré-ressonância), MB (em ressonância) e BTAH (fora de ressonância), cujos espectros de absorção no UV-Vis estão representados na Fig. 25.

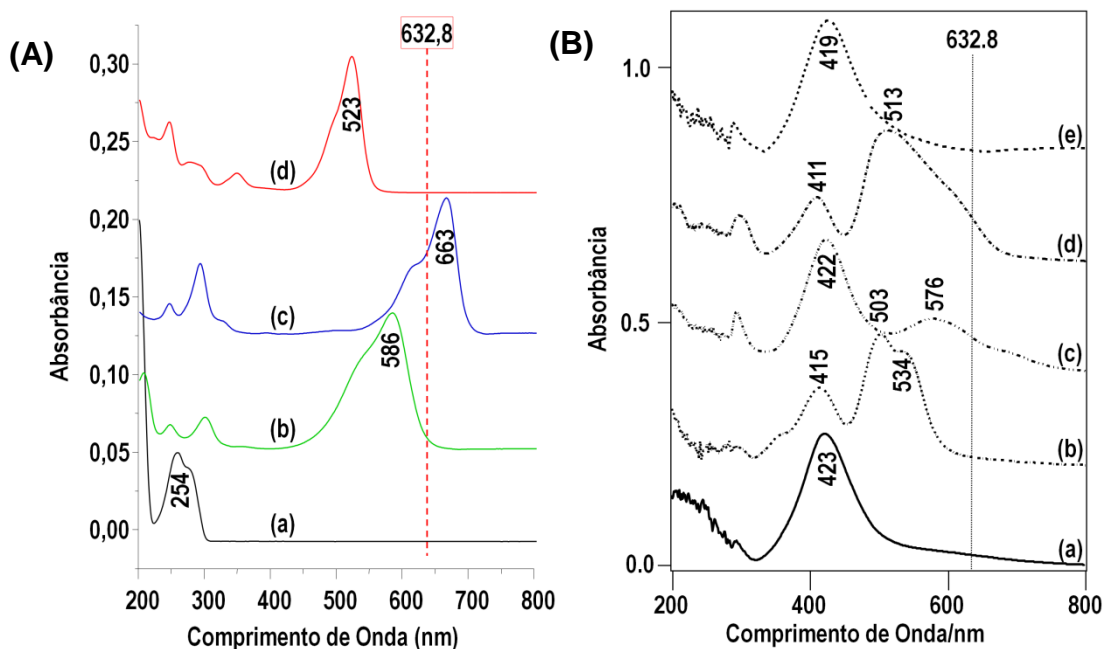


Figura 25:(A) Espectros UV-Vis das soluções dos adsorbatos (a) BTAH, (b) CV, (c) MB e (d) R6G puros na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$; (B) Do filme de AgNPs/Agar exposto a 3 gotas de 10^{-4}M de solução aquosa de adsorbato; (a) é o espectro do filme de AgNPs/Agar sem adsorbato; (b) R6G; (c) MB; (d) CV e (e) BTA.

Antes da apresentação dos resultados para o efeito SERS/SERRS desses adsorbatos em amostras de AgNPs/Agar é importante fazer uma discussão acerca dos resultados da Fig.25.

É sabido que, dependendo da concentração, os corantes R6G,^{93,94} MB⁹⁵ e CV,⁹⁶ podem ser encontrados em solução aquosa na forma de monômeros e dímeros. No caso do MB, agregados maiores podem ser formados quando adsorvidos em argilas minerais.⁹⁷ Para melhor entendermos as estruturas de absorção observadas nos espectros da Fig.25, vamos considerar o equilíbrio monômero (M)-dímero (D) com a constante K_D : $2M \rightleftharpoons D$; $K_D = \frac{[D]}{[M]^2}$. Os valores de K_D para os corantes

investigados, conforme obtidos da literatura, são apresentados na Tabela 3. Com base nos dados dessa Tabela fica evidente que, para a concentração de 10^{-4} M, os corantes R6G, MB e CV estão presentes em solução aquosa (Fig.25(A)) formando monômeros e dímeros, com predominância de monômeros. No entanto, nos espectros da Fig.25 (B) as absorções devidas aos dímeros são mais intensas que as dos monômeros correspondentes, indicando que a concentração desses corantes no filme de AgNPs/Agar é maior que em solução aquosa. De acordo com os valores de K_D da Tabela 3, o corante com maior tendência para formar dímeros em solução é o MB. Considerando o equilíbrio $(MB)_2 \rightleftharpoons 2 MB$ para a concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ ca. 100% das moléculas de MB estariam na forma de dímeros. Note que o espectro UV-vis da Fig.25B(c) mostra que o máximo de absorção do monômero MB ainda é observado, indicando que a concentração de MB no filme de AgNPs/Agar é menor que $2,5 \times 10^{-4}$ M. Observa-se também que a absorção de maior intensidade para o MB está centrada em 576 nm. Esta absorção caracteriza a formação de agregados maiores que dímeros.²² Para concentrações menores, por exemplo, $1,0 \times 10^{-5}$ M, em todos os casos a concentração de monômero é dominante ($\geq 96\%$, ver Tabela 3)

Tabela 3. Principais máximos de absorção observados nos espectros UV-vis dos adsorbatos investigados em solução e adsorvidos em AgNPs/Agar, valores das respectivas constantes de dimerização, K_D , e teor relativo (%) de monômeros (M) e dímeros (D) nas concentrações de equilíbrio dos monômeros de $5,0 \times 10^{-4}$ M e $1,0 \times 10^{-5}$ M

Adsorbato	Solução aquosa 10^{-4} M, λ/nm	AgNPs/Agar 10^{-4} M, λ/nm	K_D/M^{-1}	Teor relativo a $5,0 \times 10^{-4}$ M		Teor relativo a 10^{-5} M	
				M	D	M	D
R6G	$\sim 500(sh)^d$ 523^m	503^d 534^m	1695^a	83	17	98	2
MB	$\sim 605(sh)^d$ 663^m	576^a $\sim 670^m$	3970^b	60	40	96	4
CV	$\sim 530(sh)^d$ 586^m	513^m $\sim 580(sh)^m$	680^c	93	7	99	1
BTA	254						

m = monômero, d = dímero; a) Ref. 93; b) Ref. 95; c) Ref. 96

4.2.3 Adsorção de R6G em AgNPs/Agar

A dependência da intensidade SERS para a R6G adsorvida no substrato AgNPs/Agar foi investigada, assim como para o substrato AgNPs/Coloide, utilizando como base o pico característico de R6G apresentado em aproximadamente 612 cm^{-1} . O adsorbato apresentou comportamento similar aquele observado para R6G adsorvida em AgNPs/Coloide (ver Fig. 26), ou seja, a intensidade tende a um valor limite de acordo com que a concentração de R6G aumenta, porém com intensidades 10 vezes maiores que para a R6G adsorvida nas AgNPs/Coloide. Tal diferença de intensidade é observada porque, diferentemente das AgNPs/Coloide, as AgNPs no substrato AgNPs/Agar apresentam-se confinadas na fase gel-sólido o

que restringe seu movimento e possibilita que a quantidade de sítios SERS-ativos irradiados pela radiação laser excitante seja muito maior que a quantidade de sítios irradiados no substrato AgNPs/Coloide. Poder-se-ia argumentar ainda que a maior intensidade SERS observada neste caso se deve a uma maior concentração de dímeros de R6G. No entanto, conforme discutido anteriormente, na seção 4.2.2, para a R6G em concentrações menores que 10^{-5} M, o teor relativo de dímeros em solução seria menor que 1% e para concentração de R6G 2×10^{-6} M o teor de dímeros seria menor que 0,3%.

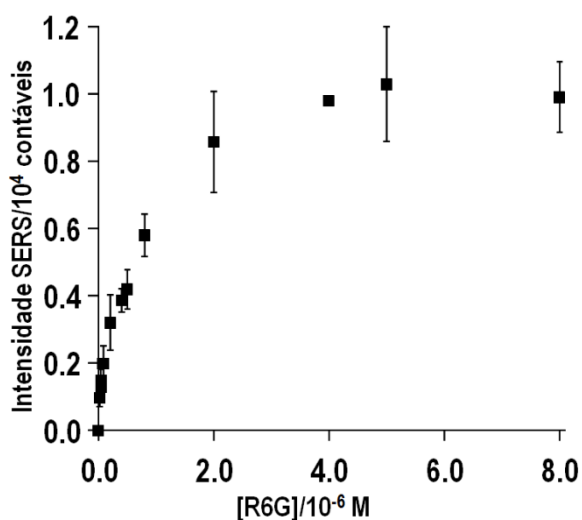


Figura 26: Dependência da intensidade SERS (em 612 cm^{-1}) na concentração da solução de R6G para R6G adsorvida no substrato AgNPs/Agar.

Em concentrações de R6G tão baixas quanto $1,0 \times 10^{-8}$ M apenas uma pequena fração da superfície está recoberta por R6G, sendo assim, a maioria dos espectros apresentam-se como eventos nulos para R6G. Apenas alguns espectros contém picos característicos do corante, o que sugere que estes espectros são referentes a uma única molécula adsorvida nas AgNPs. Estes resultados podem ser vistos na Fig. 27 que é uma representação 3D de um conjunto de 100 espectros que compõem uma réplica de triplicata da Fig. 28(b).

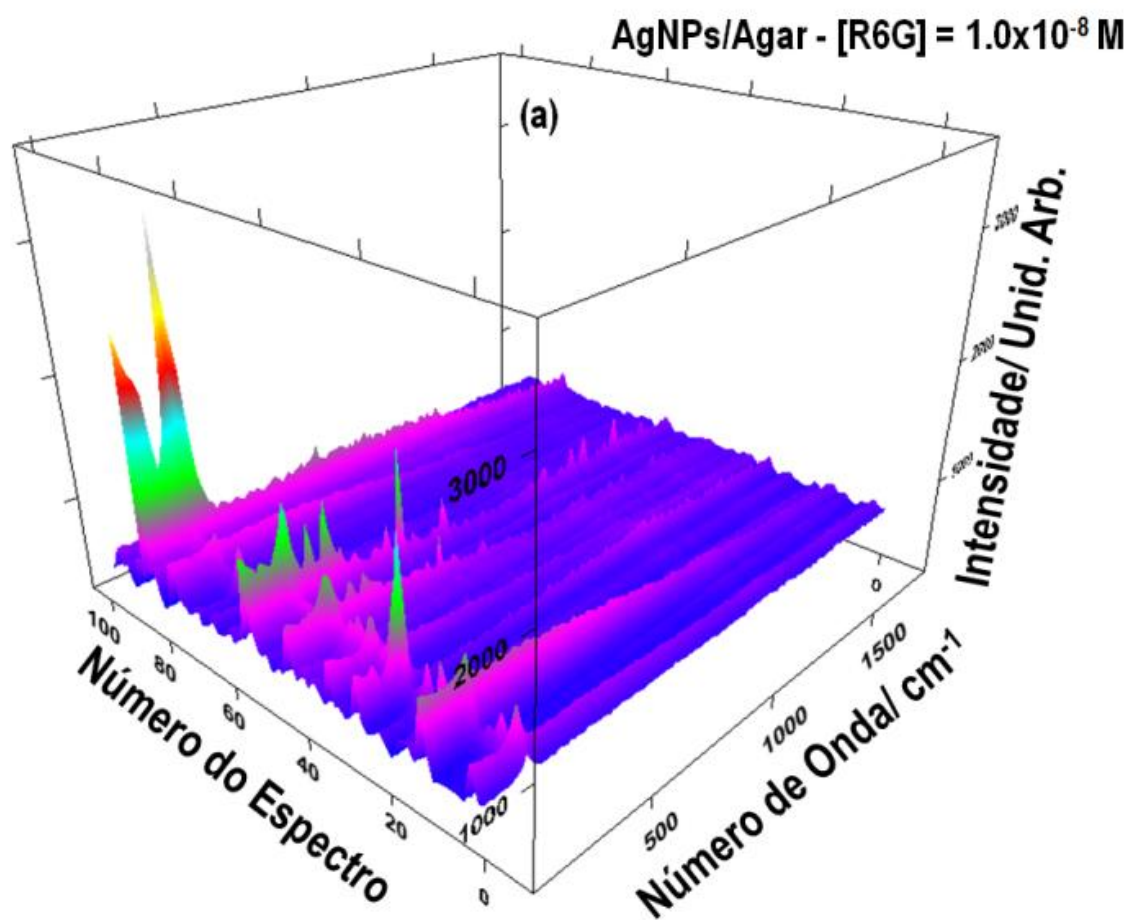


Figura 27: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 28(b).

Não obstante, um espectro simples retirado de um conjunto de 100 espectros, como por exemplo, os espectros de número 02 e 55 apresentados na Fig. 28, será totalmente diferente (em termos de intensidades relativas) da média espectral dos 100 espectros de uma réplica, apesar de toda a superfície ser SERS-ativa, como pode ser visto pela presença do pico em aproximadamente 242 cm^{-1} , na representação 3D dos 100 espectros que compõem uma réplica (Fig. 27).

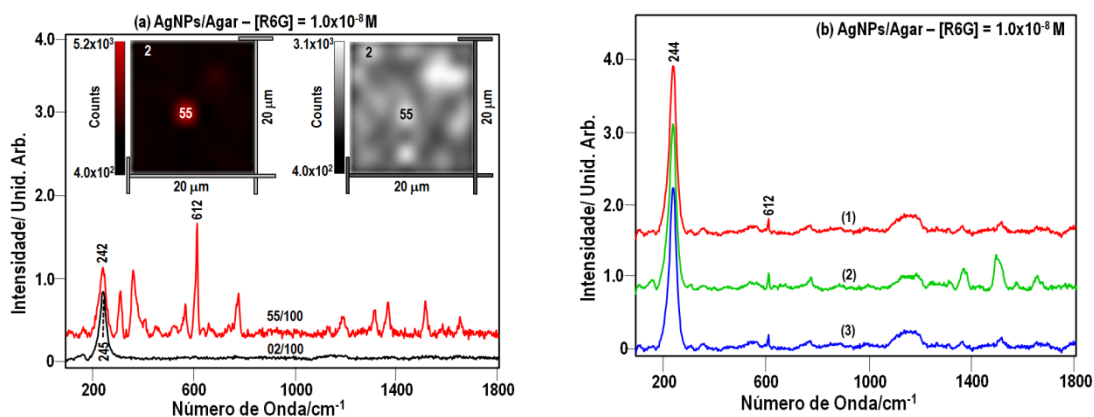


Figura 28: Espectros SERS de AgNPs/Agar com R6G $1,0 \times 10^{-8}$ M. (a) espectros únicos são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem ao lado esquerdo indica a distribuição superficial da intensidade do sinal em aproximadamente 612 cm^{-1} e a imagem ao lado direito indica a distribuição superficial da intensidade do sinal em aproximadamente 242 cm^{-1} . (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.

A heterogeneidade dos espectros para a R6G, em baixas concentrações, adsorvidas em AgNPs/Agar pode ser observada também utilizando a imagem obtida pelo microscópio Raman da área na qual foi realizado o mapeamento Raman. Sendo assim, na micrografia Raman do lado esquerdo da Fig. 28(a), as regiões com coloração vermelha mais intensa representam aquelas cuja intensidade do sinal em 612 cm^{-1} apresenta maiores intensidades, de forma que as intensidades relativas observadas nos espectros simples de números 2 e 55 corroboram com as imagens obtidas. O fato de haver pouquíssimas regiões com coloração vermelha na micrografia com mapeamento do sinal característico de R6G não indica ausência de atividade SERS, pois a imagem do lado direito da Fig. 28(a) mostra o mapeamento do sinal em aproximadamente 242 cm^{-1} , estando em acordo com a predição de que a observação de poucos eventos para R6G se deve ao fato de se estar trabalhando em regime de uma única molécula (*single molecule detection*) e não à ausência de atividade SERS do substrato. Note que uma estrutura relativamente larga é observada próximo a 1170 cm^{-1} no espectro da Fig. 28(b). Este sinal se deve, provavelmente, à matriz de Agar uma vez que é observado, também, no espectro 02 da Fig. 28(a) assim como em alguns espectros de outros adsorbatos investigados.

Para maiores concentrações de R6G, como por exemplo, $2,0 \times 10^{-6}$ M, a superfície das AgNPs/Agar apresenta-se totalmente recoberta por moléculas de R6G de forma que um espectro único, por exemplo, o espectro de número 5 da Fig. 29(a), apresenta intensidades relativas semelhantes às apresentadas nas médias correspondentes a 100 espectros individuais, conforme pode ser visto na Fig. 29(b). Isso acontece porque com o aumento da concentração de R6G a dependência da intensidade SERS em função da concentração diminui, tendendo a um valor constante. Nesse caso, todos os sítios SERS-ativos atingidos pelo feixe laser contém moléculas de R6G e o espectro resultante corresponde à média do sinal SERS de cada sítio. Neste caso, as

intensidades relativas dos espectros individuais (do conjunto de 100) apresentam intensidades relativas iguais às observadas para as médias dos 100 espectros.

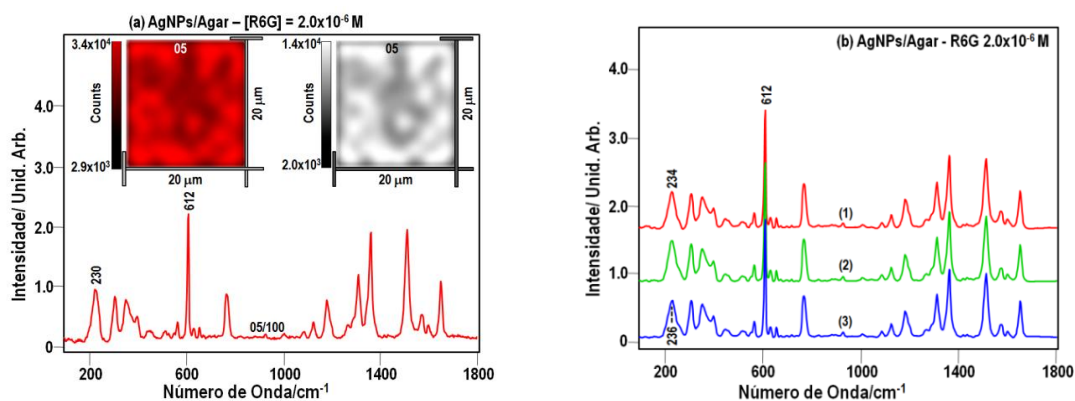


Figura 29: Espectros SERS de AgNPs/Agar com R6G $2,0 \times 10^{-6}$ M; (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem ao lado esquerdo dá a distribuição superficial da intensidade do sinal em 612 cm^{-1} e a imagem ao lado direito dá a distribuição superficial da intensidade do sinal em ca. 230 cm^{-1} ; (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.

A Fig.30, que apresenta os 100 espectros que compõem uma réplica, mostra que a $2,0 \times 10^{-6}$ M, diferentemente de baixas concentrações, há muitos espectros que apresentam picos característicos de R6G devido à superfície estar totalmente recoberta pelo corante. Outra evidência do recobrimento superficial ser praticamente 100% também pode ser vista na micrografia Raman apresentada na imagem esquerda da Fig. 29(a), indicando que em todos os sítios mapeados na superfície do filme (100) o sinal SERS em 612 cm^{-1} apresenta intensidade significativa. Na imagem à direita da Fig. 29(a) é possível confirmar a atividade SERS devido ao mapeamento superficial em relação ao pico devido ao estiramento Ag-Cl, em aproximadamente 232 cm^{-1} , que evidencia a presença de AgNPs em toda extensão da superfície.

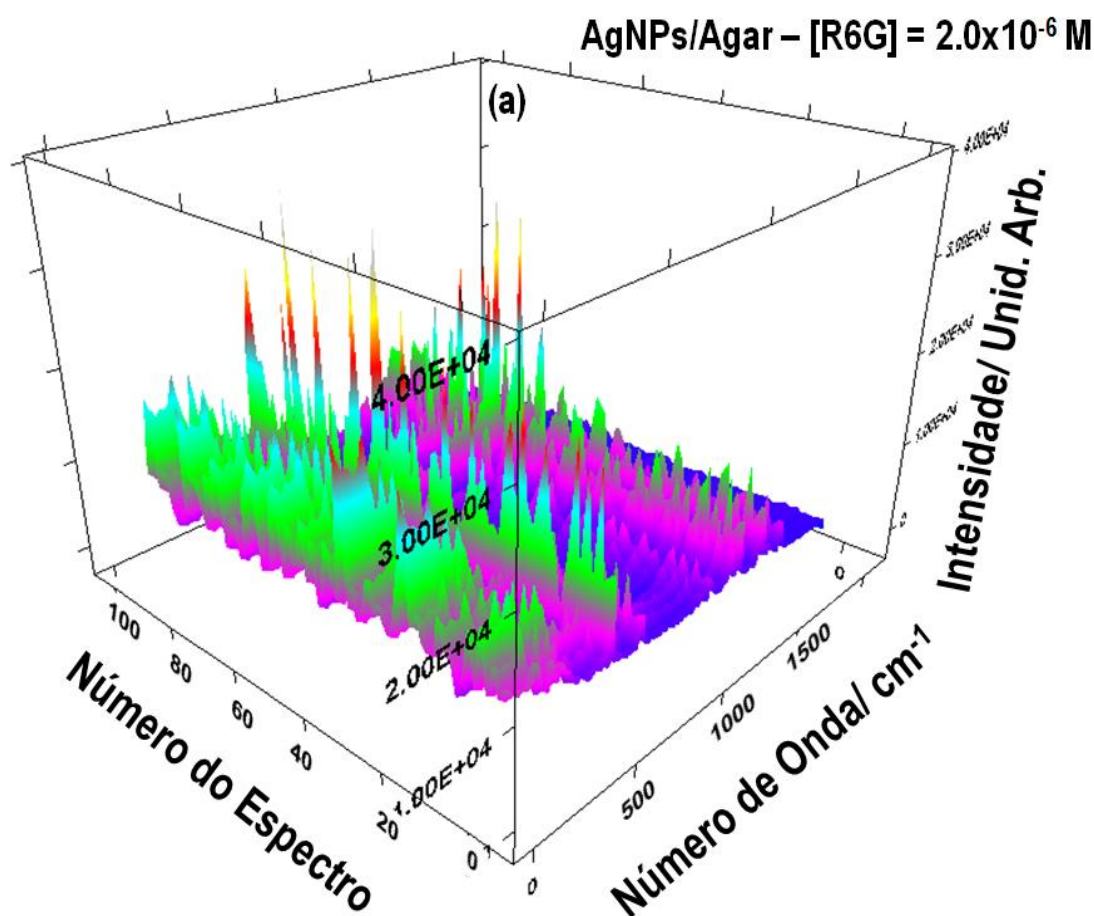


Figura 30: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 29(b).

Os resultados até agora apresentados sugerem que em concentrações de R6G acima de $5,0 \times 10^{-7}$ M a concentração da superfície local está acima do nível de detecção de uma molécula. Observa-se, também, que o modo de estiramento Ag-Cl apresenta mesmo número de onda, a 232 cm^{-1} , em um espectro simples (Fig. 29(a)) assim como na média espectral (Fig. 29(b)). Este deslocamento para menores números de onda, comparados aos valores observados na ausência de R6G (245 cm^{-1} , Fig. 29(a)) pode ser interpretado como a adsorção da R6G na superfície formando pares iônicos com o cloreto adsorvido como no caso da R6G adsorvida nas AgNPs/Coloide.

Como mencionado na parte experimental, os substratos AgNPs/Agar foram expostos à solução de R6G e espectros foram coletados 18 horas após a exposição, de forma que a maioria das moléculas de água da solução evaporou. Isso significa que o equilíbrio de adsorção envolve a R6G na matriz de Agar e a R6G adsorvida na superfície das AgNPs como:



Uma vez que não foi possível o acesso à concentração de R6G dentro da matriz de agar, as isotermas de adsorção serão avaliadas usando as concentrações de R6G em solução, conforme preparadas.

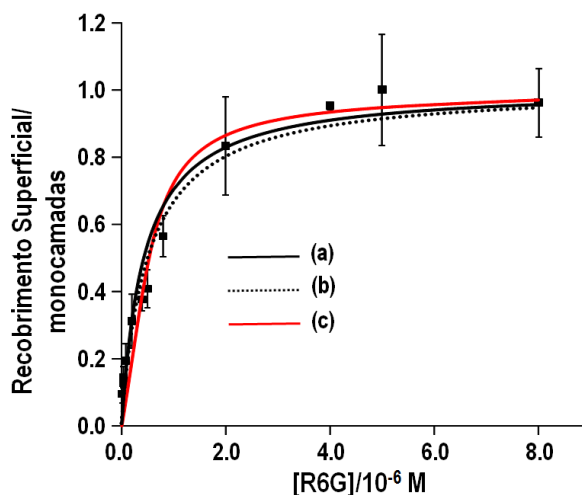


Figura 31: Recobrimento superficial (θ) para a R6G adsorvida em AgNPs/Agar como uma função da concentração de R6G. (■)Dados experimentais e curvas obtidas por ajuste dos pontos experimentais às isotermas de: (a) Langmuir 1; (b) Langmuir 2; (c) Frumkin.

O recobrimento da superfície pela R6G foi obtido como no caso anterior e as isotermas de adsorção estão apresentadas na Fig. 31. Os parâmetros utilizados na construção das isotermas de adsorção são mostrados na Tabela 4. A isoterma de Freundlich não é mostrada devido à baixa correlação dos dados experimentais com a Eq.18. Os resultados da Fig. 31 e Tabela 4 mostram que a R6G adsorve nas AgNPs em gel de agar seguindo o modelo de isoterma de Langmuir, com um coeficiente de correlação próximo da unidade e $K_L = (2,3 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, que forneceu um ΔG_{ads} de $(-36 \pm 1) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, muito próximo do valor obtido para R6G adsorvida nas AgNPs/Coloide. Os resultados também mostram que uma monocamada R6G adsorvida é obtida para concentrações próximas de $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, assim como no caso da R6G adsorvida nas AgNPs/Coloide.

Tabela 4: Parâmetros de ajuste para as isotermas mostradas na Fig. 31.

Superfície/ Adsorbato	Tipo de Isoterma	Equação	Outros Parâmetros	K	R ²
AgNPs/Agar/R6 G	Langmuir 1	23	$c = 0.97 \pm 0.02$	$2.3 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6$	0.993
	Langmuir 2	20		$1.9 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$	0.973
	Frunkim	21	$g = 0.7 \pm 0.6$	$1.1 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^6$	0.936

* c = coeficiente linear (inclinação da reta); g = parâmetro descrito pela isoterma de Frumkin, descrito na Equação 21.

De acordo com a isoterma de adsorção da Fig. 31, a $1,0 \times 10^{-8}$ Mo grau de recobrimento superficial (θ) da R6G é de 0,022, i. e., somente ca. 2% dos sítios SERS-ativos estão cobertos por R6G. Note que esse valor também é próximo do valor observado para a R6G adsorvida nas AgNPs/Coloide a uma mesma concentração. Neste sentido, pode-se assumir que a concentração da R6G na matriz de agarose é muito próxima da concentração da solução de R6G. Portanto, para os outros adsorbatos investigados, MB, CV e BTA, é razoável assumir que suas concentrações na matriz de agar serão iguais às concentrações em solução.

4.2.4 Adsorção de MB em AgNPs/Agar

O espectro UV-Vis da solução de MB (Fig. 25A(c)) e nas AgNPs Fig. 25B(c)) mostram que o monômero e o dímero do azul de metileno absorvem luz visível no comprimento de onda do laser excitante (632,8 nm). Como é sabido, o MB apresenta espectro Raman ressonante quando excitado em 632,8 nm.⁹⁸ Portanto, os espectros de MB adsorvido na superfície de AgNPs/Agar serão denominados de espectros SERRS (*surface-enhanced resonance Raman scattering*). A intensidade SERRS do sinal em 1623 cm^{-1} (com a contribuição do estiramento C-C_{anel})^{99,100} do MB adsorvido no substrato AgNPs/Agar (Fig. 32) será usada para avaliar o comportamento deste corante na presença do substrato AgNPs/Agar.

Como observado para a R6G adsorvida, tanto nas AgNPs/Coloide, como no substrato AgNPs/Agar, a intensidade SERRS do MB adsorvido nas AgNPs/Agar apresenta uma tendência à saturação com o aumento da concentração de MB, seguindo uma isoterma de adsorção.

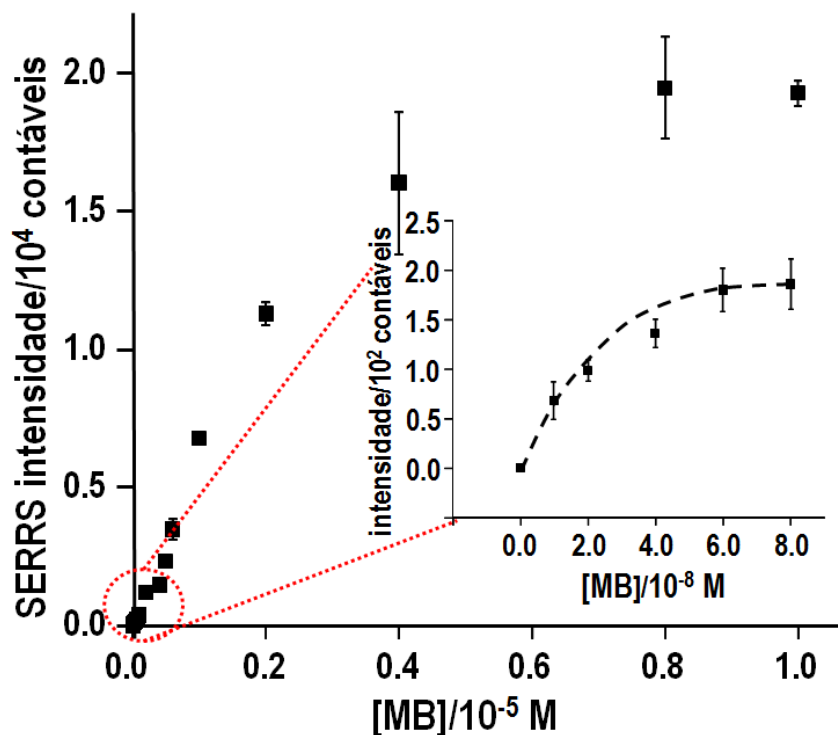


Figura 32: Dependência da intensidade SERS (em 1623 cm^{-1}) com a concentração de MB em solução para MB adsorvido no substrato AgNPs/Agar. A figura destacada mostra uma visão expandida da curva para $[\text{MB}] < 10^{-7}\text{ M}$. A linha tracejada é apenas um guia para os olhos.

Os resultados da Fig. 32 mostram que existem duas regiões de concentração do MB em que a intensidade SERS tende a um valor limite. Entretanto, na avaliação da superfície de recobrimento do MB serão assumidos que esses dados indicam a formação de duas camadas adsorvidas. As isotermas de adsorção para a adsorção de MB em substrato AgNPs/Agar são mostradas na Fig. 33 e os parâmetros de ajuste são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de ajuste para as isotermas do MB mostradas nas Fig. 33.

Superfície/ Adsorbato	Tipo de Isoterma	Equação	Outros Parâmetros	K	R ²
AgNPs/Agar/MB	Langmuir 1 Monômero	23	$c = 0.93 \pm 0.07$	$3.6 \times 10^7 \pm 0.4 \times 10^7$	0.990
	Langmuir 2 Dímero	20	$c = 0,76 \pm 0.04$	$5.1 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$	0.977
	Frumkin Dímero	21	$g = 0.94 \pm 0.06$	$2.4 \times 10^5 \pm 0.2 \times 10^5$	0.995

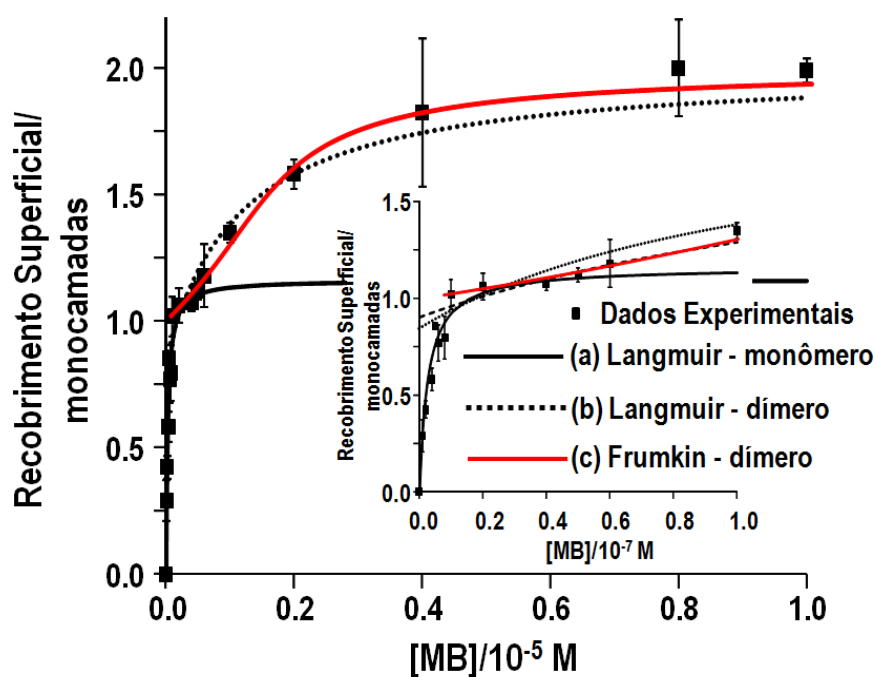


Figura 33: Recobrimento superficial (θ) do MB adsorvido em AgNPs/Agar como uma função da concentração de MB em solução. (■) Dados experimentais e curvas de ajuste dos pontos experimentais às isotermas: (a) Langmuir 1 – primeira monocamada; (b) Langmuir 2 – Segunda camada; (c) Frumkin – segunda camada. A figura em destaque mostra uma visão expandida da isoterma para concentrações abaixo de $1,0 \times 10^{-6}$ M.

Os ajustes de todos os pontos experimentais para os modelos de adsorção testados apresentaram correlação insatisfatória. Entretanto, considerando que para concentrações de MB de até $1,0 \times 10^{-7}$ M a primeira monocamada de MB foi formada, nós usamos a Eq.(23) para ajustar os dados experimentais para concentrações abaixo desse limite. O coeficiente linear obtido foi muito próximo da unidade, indicando que a essas concentrações o MB adsorvido no substrato AgNPs/Agar segue uma isoterma de adsorção de Langmuir com uma constante de adsorção, K_L de $3,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, correspondendo a uma energia livre de adsorção de $-43 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Essa constante de adsorção é uma ordem de magnitude maior que a obtida para a R6G.

A literatura reporta valores de constantes de adsorção de Langmuir para o MB variando desde $4,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, quando adsorvido na zeólita MCM-22,¹⁰¹ a $5,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, para o MB adsorvido em aerogel híbrido de esfera de carbono-grafeno com AgNPs.¹⁰² A intensidade SERS de BPE adsorvido em substratos SERS de ouro (Klarite)¹⁰³ apresenta um comportamento semelhante aos do MB mostrados na Fig. 32. Tripathiet al.¹⁰³ usaram uma expressão para ajustar os dados experimentais para uma isoterma de adsorção considerando dois tipos de sítios de adsorção. Como será discutido abaixo, os resultados da Fig. 32 serão interpretados como MB formando até duas monocamadas na faixa de concentração investigada, uma vez que esse tipo de comportamento não foi observado para os outros adsorbatos. Neste sentido, para concentrações acima de $1,0 \times 10^{-7}$ M considerou-se que a segunda camada foi formada.

Os dados experimentais para concentrações de MB acima de $1,0 \times 10^{-7}$ M foram ajustadas para uma equação similar à Eq.(20):

$$\theta = \frac{K_L(C + b)}{K_L(C + b) + 1} \quad (25)$$

Isso significa que θ será zero para $C = -b$, a concentração para a formação de uma monocamada completa de MB. O valor de b obtido no ajuste é $1,8 \times 10^{-7}$ M (ver tabela 5). Portanto, a primeira monocamada de MB deveria ser formada a $1,8 \times 10^{-7}$ M. Essa concentração cai numa faixa de concentrações onde a intensidade SERRS tende a um valor limite (essa região é marcada com um círculo tracejado na Fig. 32). O valor de K_L obtido pelo ajuste dos dados na Eq. (25) é $7,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, que é duas ordens de magnitude menor que o observado para a primeira monocamada. Este valor de constante de adsorção é razoável uma vez que o equilíbrio de adsorção envolve a interação com moléculas de MB adsorvidas na primeira monocamada.

Como aumento da concentração de MB na superfície espera-se que o MB forme dímeros e agregados maiores.⁹⁸ Assim, tentou-se ajustar os dados experimentais para concentrações de MB acima de $1,0 \times 10^{-7}$ M ao modelo de isoterma de adsorção de Frumkin. (Eq. 21). Como os resultados da Tabela 5 mostram, a constante de adsorção obtida ($2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) é da mesma ordem da obtida pela isoterma de Langmuir ($5,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). De acordo com a isoterma de Frumkin, obteve-se um parâmetro

de interação $g = 0,9$, indicando que a interação entre as moléculas de MB adsorvidas é atrativa (valores positivos de g indicam atração e valores negativos indicam repulsão) devido ao alto valor da constante de dimerização do MB quando comparado aos demais corantes investigados. Considerando a constante de dimerização do MB ($K_{\text{dimer}} = 3970 \text{ M}^{-1}$),⁹⁸ a uma concentração de 10^{-7} M , 99,96% do MB está na forma de monômero. Portanto, a um recobrimento superficial (θ) de MB abaixo de 0,5 espera-se detectar sinais SERRS do monômero de MB adsorvido.

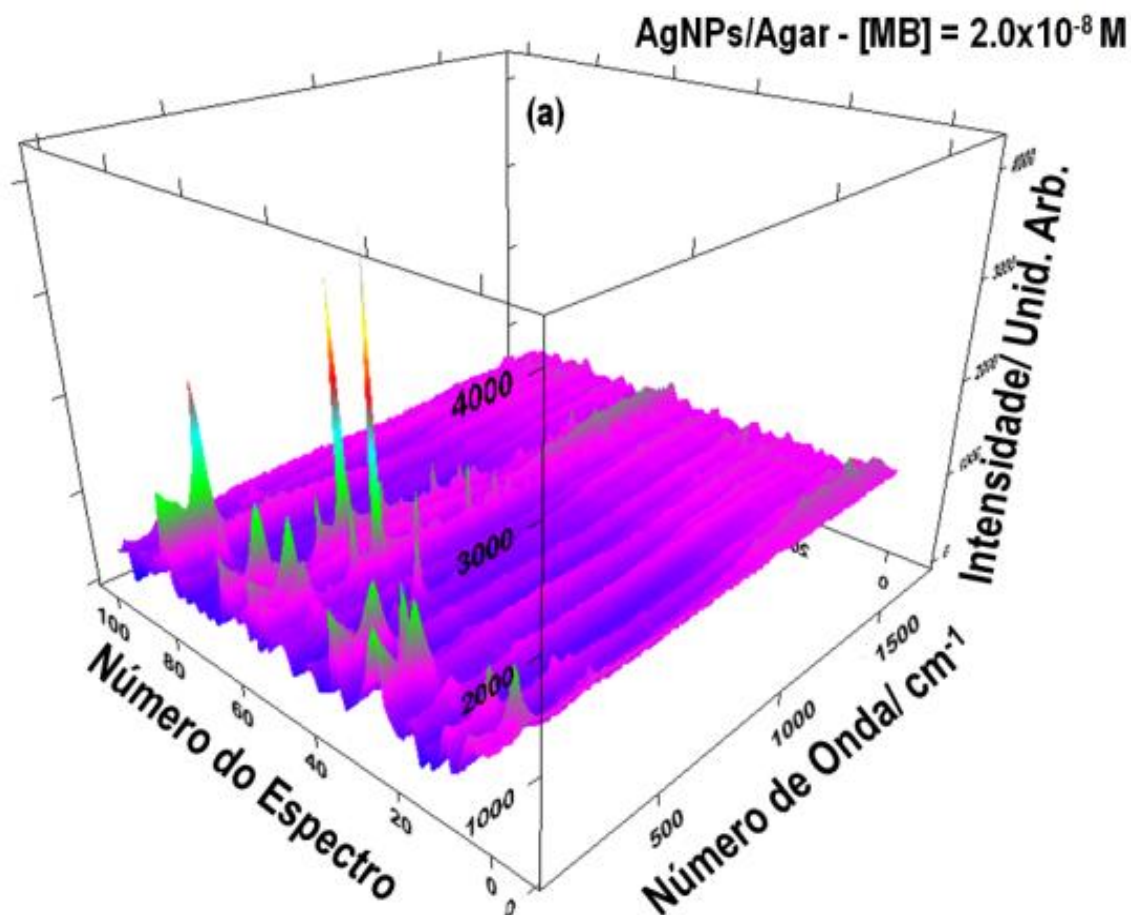


Figura 34: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 35(b).

A Fig. 34 mostra a representação 3D de um conjunto de 100 espectros que constitui uma réplica onde é possível observar que, assim como para a R6G adsorvida no substrato AgNPs/Agar, a baixas concentrações, tais como $2,0 \times 10^{-8} \text{ M}$, a maioria dos espectros apresentam eventos nulos para o corante e nos espectros cujos picos característicos do MB aparecem, é possível observar a predominância do monômero (ver discussão abaixo).

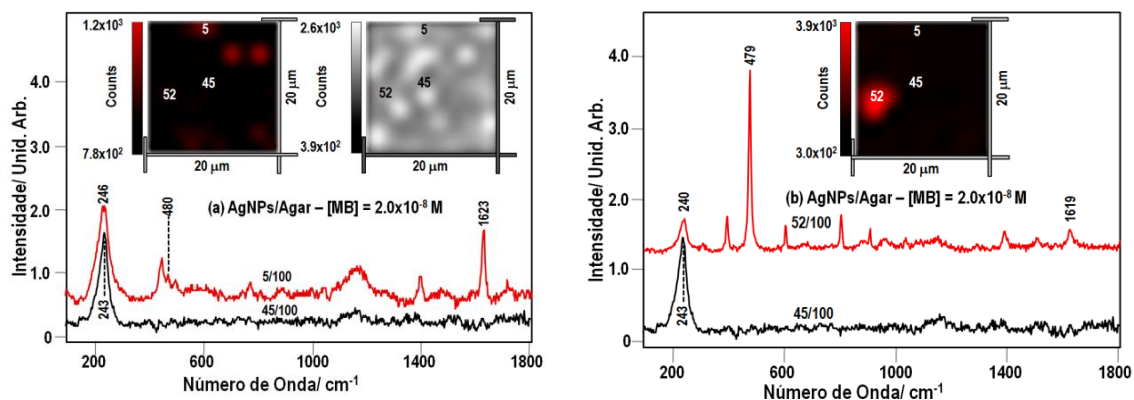


Figura 35: Espectros SERS de AgNPs/Agar com MB $2,0 \times 10^{-8}$ M. espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. (a) A imagem ao lado esquerdo mostra a distribuição superficial da intensidade do sinal SERRS em $ca. 1623 \text{ cm}^{-1}$ e a imagem ao lado direito indica a distribuição superficial do sinal em $ca. 243 \text{ cm}^{-1}$. (b) A imagem mostra a distribuição superficial da intensidade do sinal em $ca. 479 \text{ cm}^{-1}$.

Mapeamentos Raman do MB adsorvido no substrato AgNPs/Agar na concentração de $2,0 \times 10^{-8}$ M são apresentados na Fig. 35. A imagem da esquerda na Fig. 35(a) foi obtida para o deslocamento Raman a 1623 cm^{-1} , enquanto que a imagem na Fig. 35(b) foi obtida para o deslocamento Raman centrado em $ca. 479 \text{ cm}^{-1}$.

Resultados da literatura sobre estudos SERRS de MB adsorvido em eletrodos de prata em condições de monocamada,⁹⁸ em filmes LbL (*Layer by Layer*) em ITO contendo AgNPs,¹⁰⁴ em nanotubos de ouro,¹⁰⁵ bem como de medidas Raman ressonante (RRS) de MB adsorvido em nanopartículas de maguemita¹⁰⁶ e em heteroestruturas de ZnO/TiO_2 ,¹⁰⁷ mostram que o monômero de MB apresenta um sinal Raman forte em $ca. 480\text{-}492 \text{ cm}^{-1}$, que é atribuído ao modo de deformação no plano do anel tiazínico do monômero de MB adsorvido.⁹⁸ É importante mencionar que o sinal do monômero do MB adsorvido em nanopartículas de maguemita também é observado com excitação em $514,5 \text{ nm}$, enquanto nenhum sinal de dímero é observado. Além disso, esse sinal não é observado nem no espectro RRS de MB em fase sólida nem em solução. Portanto, para baixos recobrimentos superficiais, por exemplo, MB na concentração $2,0 \times 10^{-8}$ M, os sinais SERRS são monômeros individuais de MB, como o espectro numerado como 52 na Fig. 35(b) que mostra um sinal forte em 479 cm^{-1} . Nessa concentração vários espectros não apresentam sinais de MB, porém, o sinal SERS do estiramento Ag-Cl é observado na maioria dos espectros, como indicado pela imagem do mapeamento Raman ao lado direito da Fig. 35(a). Diferentemente da R6G e do CV (ver abaixo), o sinal SERS largo em 245 cm^{-1} não desloca para menores números de onda com o aumento do recobrimento superficial, como acontece para o caso de R6G e CV (ver Figs. 29 e 41), sugerindo que o MB interage com a superfície da prata diferentemente de R6G e CV. A energia livre de adsorção, ΔG_{ads} , para a primeira monocamada de MB foi estimada como sendo $-43 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto para R6G e CV foi estimado o valor de $-36 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Mais adiante, durante a discussão da adsorção do BTA nós voltaremos a esse ponto.

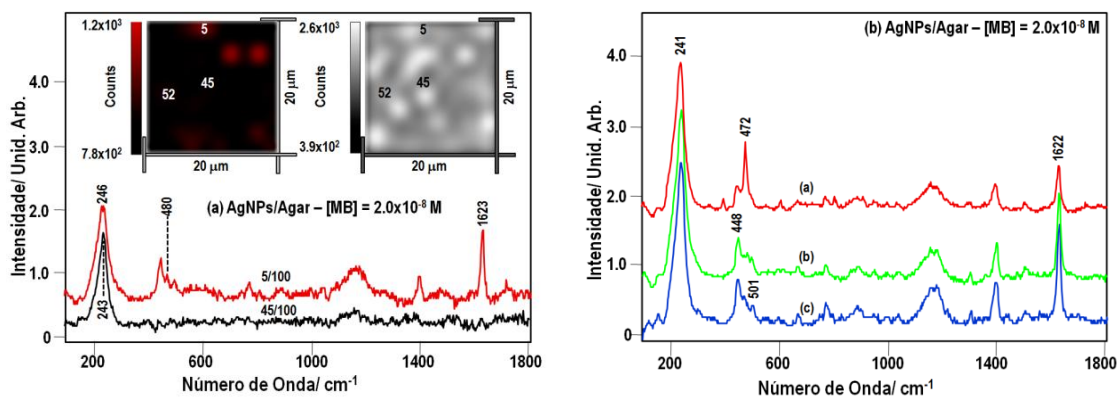


Figura 36: Espectros SERS de AgNPs/Agar com MB $2,0 \times 10^{-8}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem do lado esquerdo representa a distribuição superficial da intensidade do sinal SERRS em $ca. 1623 \text{ cm}^{-1}$ e a imagem ao lado direito representa a distribuição superficial da intensidade do sinal SERS em $ca. 243 \text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento Ag-Cl. (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.

É interessante destacar que alguns espectros individuais do MB, na concentração de $2,0 \times 10^{-8}$ M, apresentam sinais SERRS característicos do dímero do MB, em 448 e 500 cm^{-1} . Como observado para a R6G, os espectros individuais do MB nesse nível de concentração apresentam intensidades relativas diferentes das médias espectrais dos conjuntos de 100 espectros que compõem as réplicas (comparar o espectro 5/100 da Fig. 36(a) com os espectros da Fig. 36(b)). Igualmente, observa-se também que as intensidades relativas nos espectros das médias também são diferentes nos três espectros. Esses dados indicam que os espectros individuais são espectros de eventos únicos em nível de detecção de uma molécula (SMD).

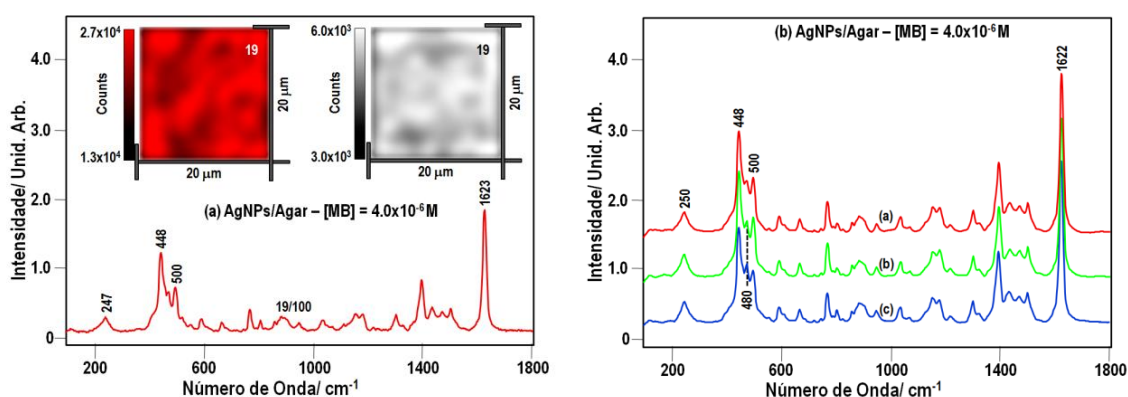


Figura 37: Espectros SERS de AgNPs/Agar com MB $4,0 \times 10^{-6}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem do lado esquerdo representa a distribuição superficial da intensidade do sinal SERRS em $ca. 1623 \text{ cm}^{-1}$ e a imagem ao lado direito

representa a distribuição superficial da intensidade do sinal SERS em ca. 243 cm^{-1} referente ao estiramento Ag-Cl. (b) Média de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.

Com o aumento da concentração de MB, por exemplo, a $4,0 \times 10^{-6}\text{ M}$, quando a segunda camada já está completa, o mapeamento do sinal Raman do MB em 1623 cm^{-1} (imagem da direita da Fig. 37(a)) e o sinal em 247 cm^{-1} (imagem da direita da Fig. 37(b)) mostram que a superfície das AgNPs já está completamente recoberta por moléculas de MB. Neste sentido, o espectro individual numerado como 19 na Fig. 37(a) mostra intensidades relativas semelhantes àsquelas das médias das três réplicas dos 100 espectros apresentados na Fig. 37(b). Observa-se que os espectros SERRS da Fig. 37 mostram sinais tanto do dímero, como do monômero de MB. Entretanto, o monômero aparece com menor intensidade relativa. A Fig. 38 mostra uma representação 3D do conjunto completo dos 100 espectros correspondente a uma das réplicas apresentadas na Fig. 37(b). A partir desta imagem é possível concluir que todos os sítios superficiais da área investigada estão recobertos por moléculas de MB, uma vez que todos os espectros apresentam os sinais característicos do MB.

É sabido que a dissociação do dímero do MB em monômeros é um processo endotérmico.¹⁰⁸ Como estamos trabalhando em uma região muito próxima da ressonância, o aquecimento local produzido pela absorção do laser excitante e a radiação espalhada promove uma dissociação local do dímero em monômero, razão pela qual o sinal SERRS do monômero em ca. 480 cm^{-1} é observado nos espectros registrados em concentrações maiores de MB.

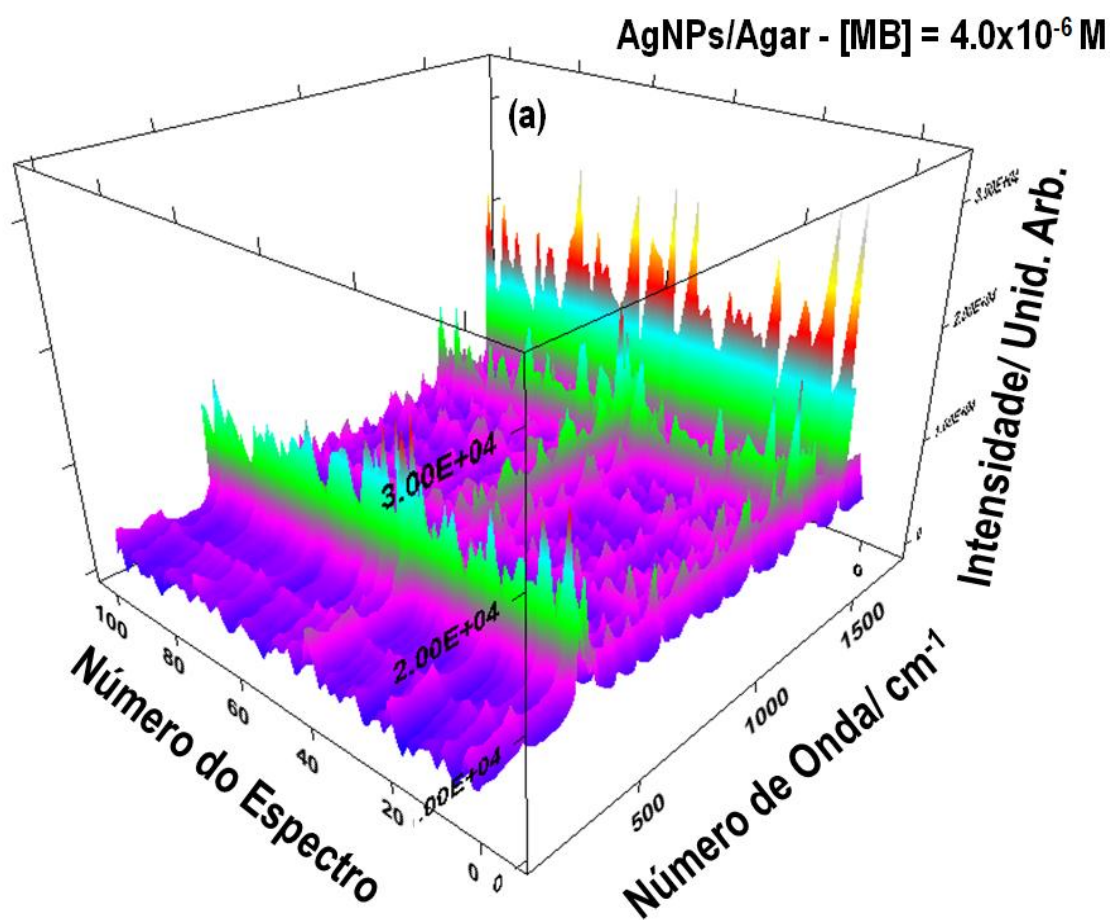


Figura 38: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 37(b).

4.2.5 Adsorção de CV em AgNPs/Agar

Como a radiação usada para excitação dos espectros Raman (632,8 nm) está muito próximo do máximo de absorção do monômero de CV (586 nm), os espectros Raman do CV adsorvido nas AgNPs/Agar serão chamados de espectros SERRS (surface-enhanced resonance scattering).

A intensidade SERRS do sinal em 1173 cm^{-1} do CV adsorvido no substrato AgNPs/Agar como uma função da concentração de CV mostra um comportamento semelhante aquele apresentado pelos adsorbatos anteriores, a intensidade alcança um valor limite para concentrações acima de $4,0 \times 10^{-6}$ M (ver Fig. 39). O sinal SERRS em 1173 cm^{-1} com uma contribuição do estiramento CC do anel¹⁰⁹ foi usado para obter o recobrimento superficial (θ) que é mostrado na Fig. 40. Os dados experimentais foram ajustados para as isotermas de Langmuir e Frumking e os parâmetros de ajuste são apresentados na Tabela 6.

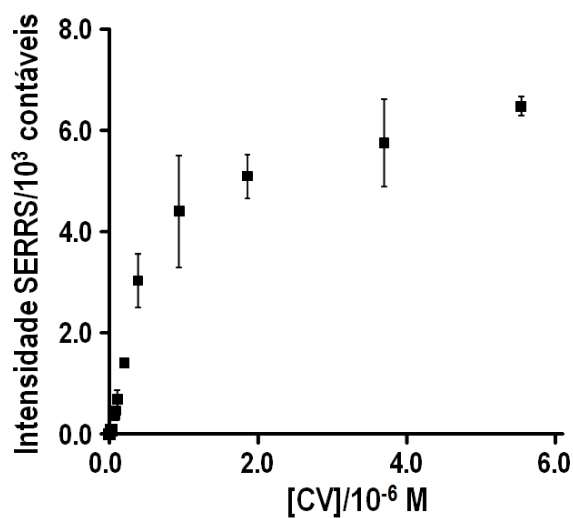


Figura 39: Intensidade SERRS (em 1173 cm^{-1}) de CV adsorvido no substrato como uma função da concentração de CV.

Tabela 6: Parâmetros de ajuste para as isotermas mostradas na Fig. 40.

Superfície/ Adsorbato	Tipo de Isoterma	Equação	Outros Parâmetros	K	R ²
AgNPs/Agar/CV	Langmuir 1	23	$c = 0.88 \pm 0.03$	$1.2 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$	0.990
	Langmuir 2	20		$1.8 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$	0,987
	Frumkin	21	$g = - 0.10 \pm 0.07$	$2.3 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$	0.999

* c = coeficiente linear (inclinação da reta); g = parâmetro descrito pela isoterma de Frumkin, descrito na Equação 21.

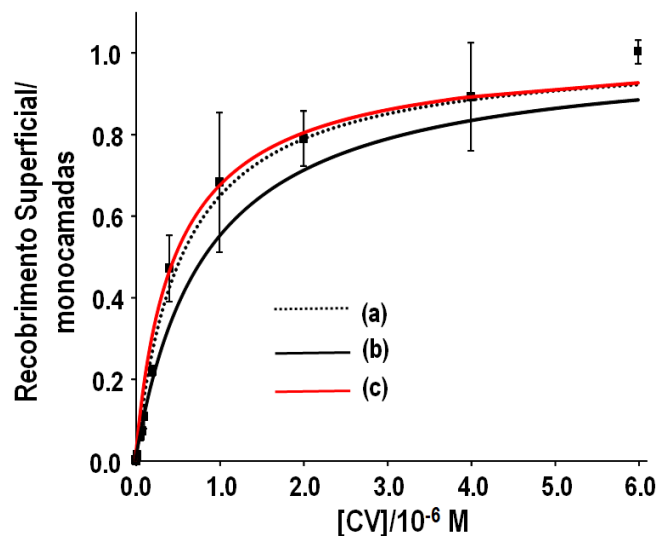


Figura 40: Recobrimento superficial (θ) para CV adsorvido em AgNPs/Agar como uma função da concentração de CV. (■) Dados experimentais; e curvas obtidas por ajustes dos pontos experimentais às isotermas: (a) Langmuir 1; (b) Langmuir 2; (c) Frumkin.

Os resultados da Tabela 5 para isotermas do CV mostram que o melhor ajuste foi obtido para a isoterma de Frumkin, com uma constante de adsorção de $(2,3 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e $g = -0,1$, indicando que a interação entre as moléculas de CV é repulsiva. Essa constante de adsorção do CV leva a um ΔG_{ads} de $-36 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Existem alguns trabalhos na literatura que reportam a obtenção do recobrimento superficial (θ) através de medidas de intensidade SERRS do CV adsorvido em superfícies metálicas nanoestruturadas e que as curvas obtidas se comportam como isotermas de Freundlich.^{110,111} No entanto, o ajuste dos dados experimentais da Fig.40 à isoterma de Freundlich forneceu resultados insatisfatórios.

Entretanto, existem também trabalhos mostrando que o CV adsorve em zeólita MCM-22¹⁰¹ e sílica fundida¹¹² seguindo um modelo de isoterma de adsorção de Langmuir e, no caso do CV adsorvido em zeólita MCM-22 a constante de adsorção foi $9,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

O primeiro espectro SERRS do CV foi reportado em 1977 onde, no mesmo artigo, Jeanmaire e Van Duyne apresentaram os primeiros espectros SERS de piridina adsorvida em eletrodos de prata.¹¹³ Os espectros do CV apresentados na Fig. 41 são semelhantes àqueles espectros apresentados no trabalho citado acima.

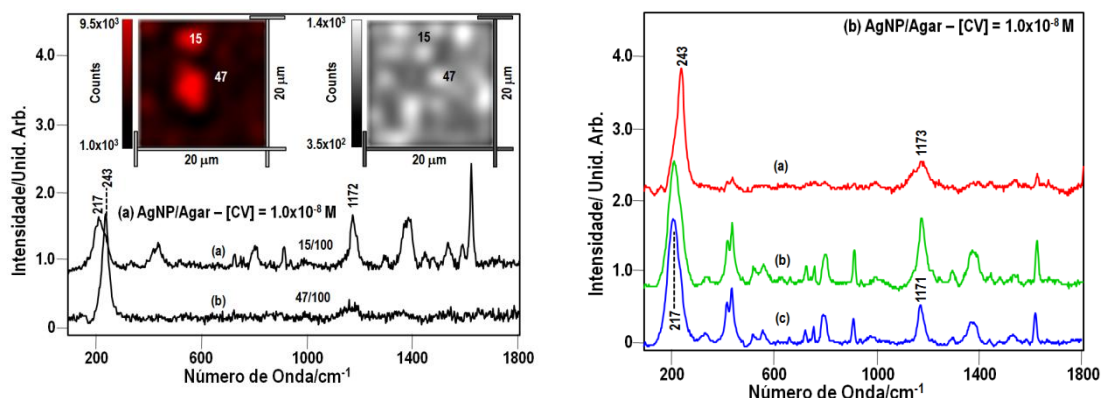


Figura 41: Espectros SERRS de AgNPs/Agar com CV $1,0 \times 10^{-8}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem à esquerda corresponde à distribuição superficial da intensidade SERRS do sinal em ca. 1173 cm^{-1} e a imagem à direita mostra a distribuição da intensidade SERS do sinal em ca. 243 cm^{-1} . (b) Médias de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.

Como nos casos anteriores, na menor concentração investigada $1,0 \times 10^{-8}$ M, dos 100 espectros coletados na área superficial investigada, vários não apresentam sinais SERRS do CV, mas apresentam um sinal próximo de 243 cm^{-1} que se deve ao estiramento Ag-Cl (ver a imagem da direita da Fig. 41(a)). Já a imagem à esquerda da Fig. 41(b) mostra a distribuição do sinal em aproximadamente 1173 cm^{-1} na área investigada, de forma que nas regiões em vermelho o sinal é intenso, como no caso do espectro individual 15/100. Entretanto, o espectro 47/100, retirado de uma região mais escura, conforme esperado, não apresenta nenhum sinal SERRS característico de CV, mostra apenas o sinal SERS relacionado ao estiramento Ag-Cl.

Conforme obtido para os outros corantes, em baixas concentrações de CV, aparecem muitos eventos nulos para os sinais SERRS do CV (ver Fig. 42). Observa-se também que os espectros correspondentes às médias (triplicatas) dos conjuntos de 100 espectros individuais apresentam intensidades relativas diferentes e a diferença nas intensidades relativas é mais significativa ainda quando se compara o espectro individual 15/100 (Fig.41(a)) com os espectros das médias (Fig. 41(b)).

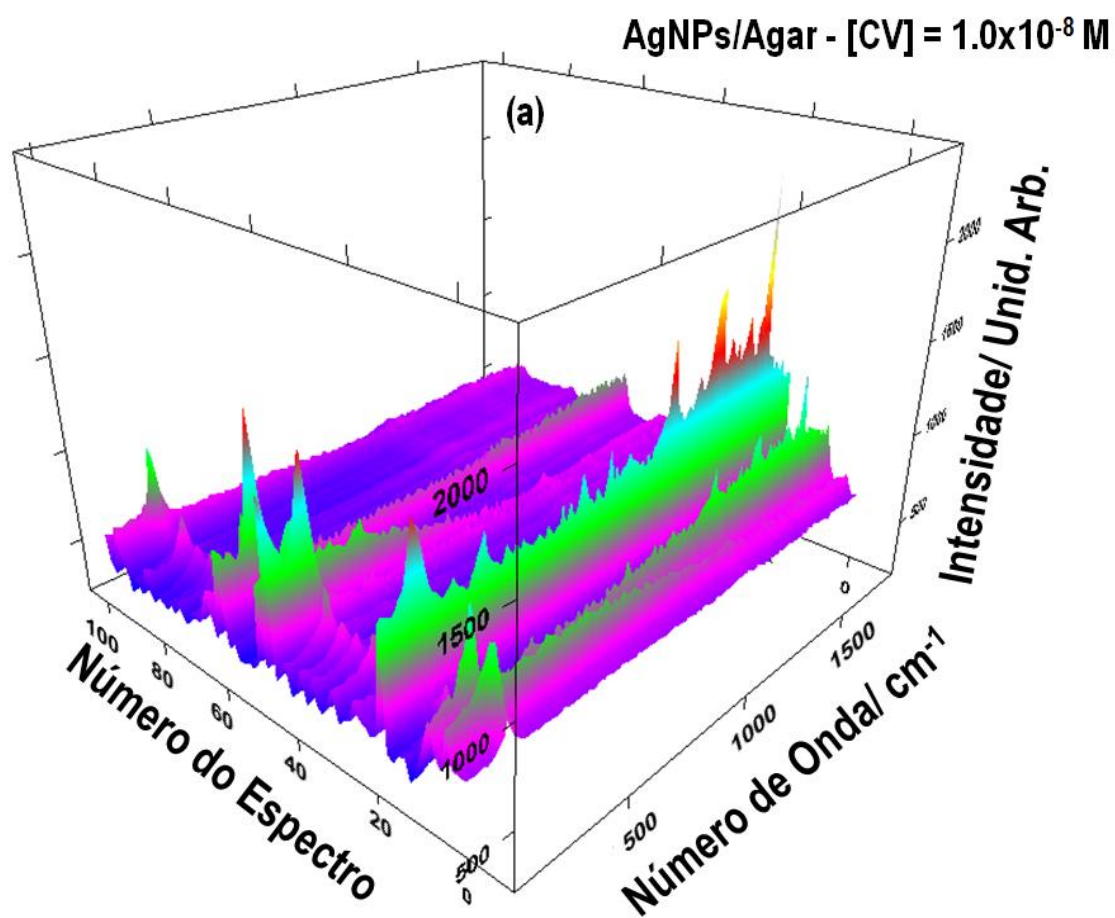


Figura 42: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 41(b).

Aumentando-se a concentração de CV, por exemplo, para $2,0 \times 10^{-6}$ M, onde já se tem a superfície das AgNPs totalmente recobertas por uma monocamada de CV, os espectros individuais, como o espectro 30/100(Fig. 43(a)), apresentam intensidades relativas semelhantes às observadas para as médias de 100 espectros (Fig. 43(b)). Esses resultados indicam que à concentração de CV de $1,0 \times 10^{-8}$ M os espectros observados correspondem a espectros em nível de detecção de uma molécula (SMD).

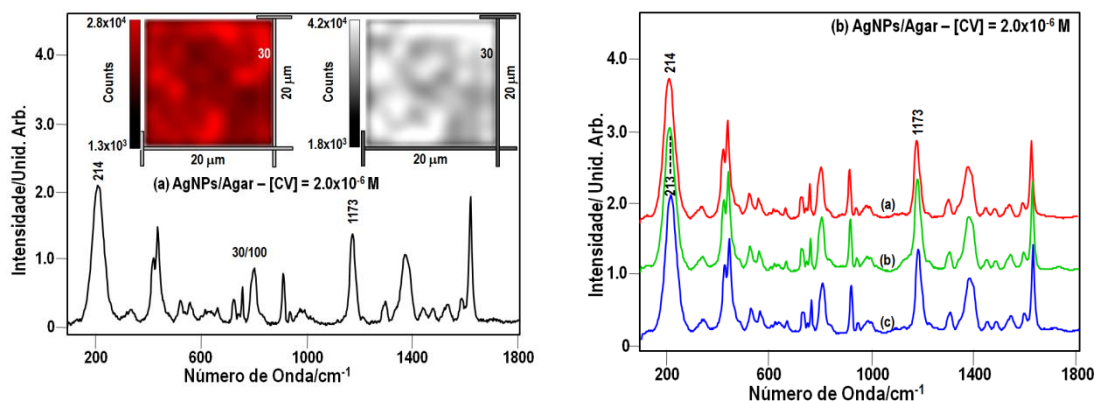


Figura 43: Espectros SERS de AgNPs/Agar com CV $2,0 \times 10^{-6}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem à esquerda corresponde à distribuição superficial da intensidade SERRS do sinal em ca. 1173 cm^{-1} e a imagem à direita mostra a distribuição da intensidade SERS do sinal em ca. 243 cm^{-1} . (b) Médias de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.

Ao completar uma monocamada, na concentração de $2,0 \times 10^{-6}$ M, a área superficial analisada encontra-se completamente recoberta de CV, como é possível observar na imagem ao lado esquerdo da Fig. 43 (a) cujo mapeamento foi feito em relação ao sinal SERRS do CV em ca. 1173 cm^{-1} . Já a imagem ao lado direito mostra que nos mesmos sítios superficiais mapeados, o sinal SERS do Cl^- adsorvido, em ca. 214 cm^{-1} , também é observado. O recobrimento superficial total das AgNPs por moléculas de CV também pode ser confirmado pelo conjunto de 100 espectros que compõem uma das réplicas como mostrado na representação 3D da Fig. 44. Note também que, como obtido para os outros corantes, após a formação da monocamada os espectros individuais (Fig.43(a)) apresentam intensidades relativas semelhantes às observadas para as médias (Fig. 43(b)).

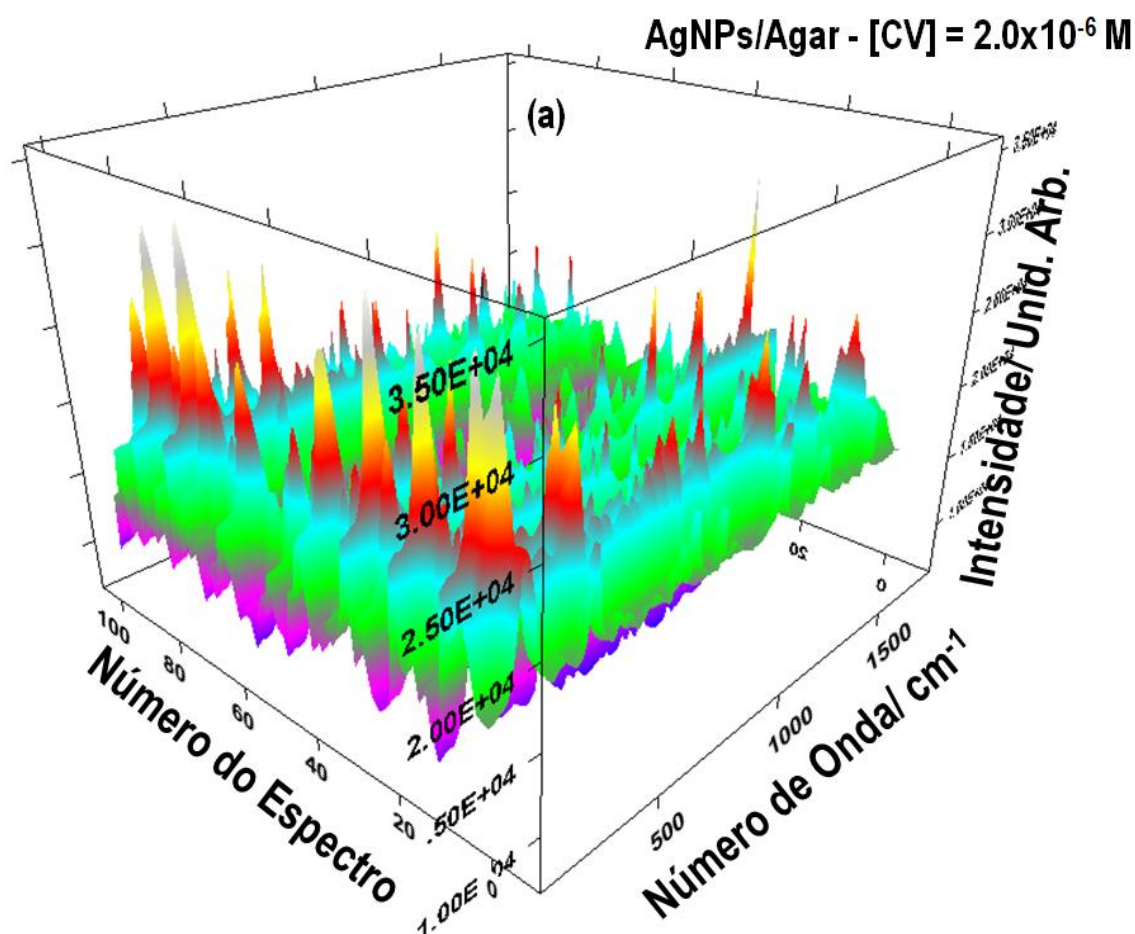


Figura 44: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 43 (b).

É importante mencionar que o sinal SERS próximo de 243 cm⁻¹ desloca para menores números de onda à medida que a concentração superficial de CV aumenta, semelhantemente ao comportamento observado para a adsorção de R6G. Para CV na concentração de 2x10⁻⁶ M, o modo Ag-Cl aparece em 214 cm⁻¹, indicando que o cátion CV interage eletrostaticamente com o cloreto adsorvido formando um par iônico na superfície das AgNPs.

4.2.6 Adsorção de BTA em AgNPs/Agar

O benzotriazol neutro, BTAH, em solução aquosa, está em equilíbrio com seu ânion correspondente, o benzotriazolato (BTA⁻): $BTAH \rightleftharpoons BTA^- + H^+$, $K_a = 4,27 \times 10^{-9}$ M.¹¹⁴ Devido à baixa solubilidade do BTAH em água o sinal SERS do BTAH adsorvido no substrato AgNPs/Agar não pode ser obtido. Para aumentar a solubilidade do BTAH trabalhou-se com soluções alcalinas de BTAH (ver parte experimental). Entretanto, como será mostrado, as espécies adsorvidas observadas nos espectros SERS apresentados abaixo são do ânion benzotriazolato (BTA⁻), que será chamado no decorrer deste trabalho de BTA. O espectro de

absorção da Fig. 25 mostra que o BTAH não absorve radiação visível e os espectros SERS do BTA adsorvido no substrato AgNPs/Agar não apresentam sinais tão intensos quanto os observados para a R6G, MB e CV.

Para avaliar a dependência da intensidade SERS do BTA em relação à concentração de BTA (Fig. 45) foi usada a intensidade do sinal SERS em 784 cm^{-1} , que é atribuído ao modo vibracional correspondente à respiração do anel benzênico.¹¹⁵

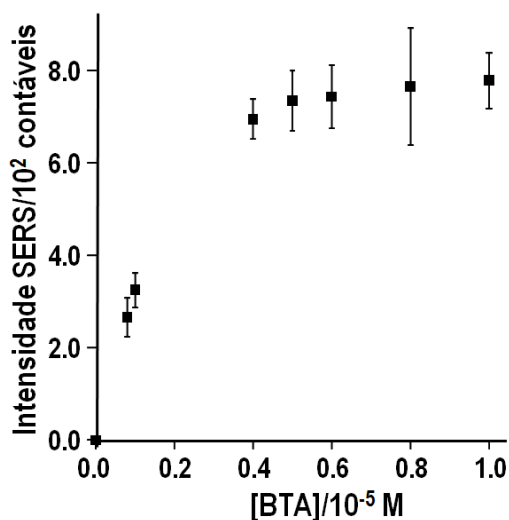


Figura 45: Intensidade SERS (em 784 cm^{-1}) de BTA adsorvido em filme de AgNPs/Agar.

Como nos casos anteriores, a intensidade SERS aproxima-se de um valor limite com o aumento da concentração de BTA, indicando que uma saturação superficial é alcançada. O recobrimento superficial do BTA, θ , em função da concentração de BTA é apresentado na Fig. 46, com as curvas correspondendo aos ajustes dos dados experimentais aos modelos de adsorção de Langmuir e Frumkin. Os parâmetros correspondentes aos ajustes são apresentados na Tabela 7. Nós tentamos ajustar os dados para o modelo de Freundlich, mas nenhuma reta foi obtida para os dados $\log \theta$ vs $\log [\text{BTA}]$.

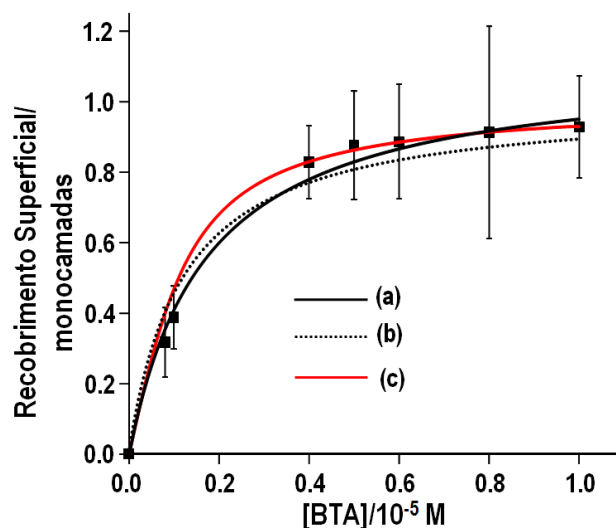


Figura 46: Recobrimento superficial (θ) para o BTA adsorvido em AgNPs/Agar como uma função da concentração de BTA. (■) Dados experimentais; e curvas correspondentes ao ajuste dos pontos experimentais às isothermas: (a) Langmuir 1; (b) Langmuir 2; (c) Frumkin.

Tabela 7: Parâmetros de ajuste para as isothermas mostradas nas Fig. 46.

Superfície/ Adsorbato	Tipo de Isotherma	Equação	Outros Parâmetros	K	R ²
AgNPs/Agar/ BTAH	Langmuir 1	23	$c = 0.83 \pm 0.03$	$7.0 \times 10^5 \pm 0.8 \times 10^5$	0.992
	Langmuir 2	20		$1.1 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$	0.938
	Frumkin	21	$g = 0.1 \pm 0.3$	$9.6 \times 10^5 \pm 4.8 \times 10^5$	0.989

* c = coeficiente linear (inclinação da reta); g = parâmetro descrito pela isoterma de Frumkin, descrito na Equação 21.

Os resultados da Tabela 7 mostram que os melhores ajustes foram obtidos para Langmuir 1 e Frumkin, correspondendo ao ajuste dos dados às Eqs. 21 e 23, respectivamente. As constantes de adsorção foram da mesma ordem de magnitude, $(6,5 \pm 0,8) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $(6,0 \pm 2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Essas constantes de adsorção são próximas daquelas observadas para o BTAH adsorvido em Cu e ligas de CuZn ($1,4 \times 10^6$ a $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), quando ele adsorve formando um filme polimérico de $[\text{Cu(I)BTA}]_n^{116}$ e correspondem a uma energia livre de Gibbs de adsorção (ΔG_{ads}) de $-33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

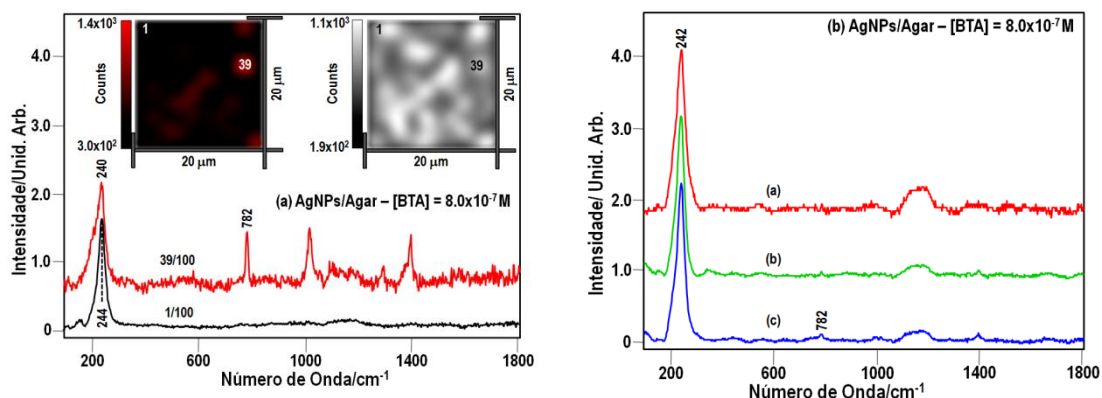


Figura 47: Espectros SERS de AgNPs/Agar com BTA $8,0 \times 10^{-7}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem do lado esquerdo representa a distribuição da intensidade SERS do sinal em $ca. 782 \text{ cm}^{-1}$ e a imagem do lado direito representa a distribuição superficial do sinal SERS em $ca. 242 \text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento Ag-Cl. (b) Médias de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.

O mapeamento Raman apresentados na Fig. 47 mostra, assim como para os outros adsorbatos, que a baixas concentrações de BTA a superfície de AgNPs é recoberta pela adsorção de cloreto, caracterizada pelo sinal SERS próximo de 244 cm^{-1} (Fig. 47(a)). Na presença de BTA, é observado um pico característico em aproximadamente $239-240 \text{ cm}^{-1}$.

O conjunto completo de 100 espectros usados para gerar as imagens da Fig.47 é apresentado na Fig. 48 e mostra que existem vários eventos nulos para sinais do BTA, mas o sinal na faixa de $239-244 \text{ cm}^{-1}$ é observado em todos os espectros. Entretanto, semelhante ao MB e diferentemente da R6G e CV, esse sinal ($239-244 \text{ cm}^{-1}$) não desloca para menores números de onda à medida que o recobrimento superficial do adsorbato aumenta.

AgNPs/Agar - [BTA] = 8.0×10^{-7} M

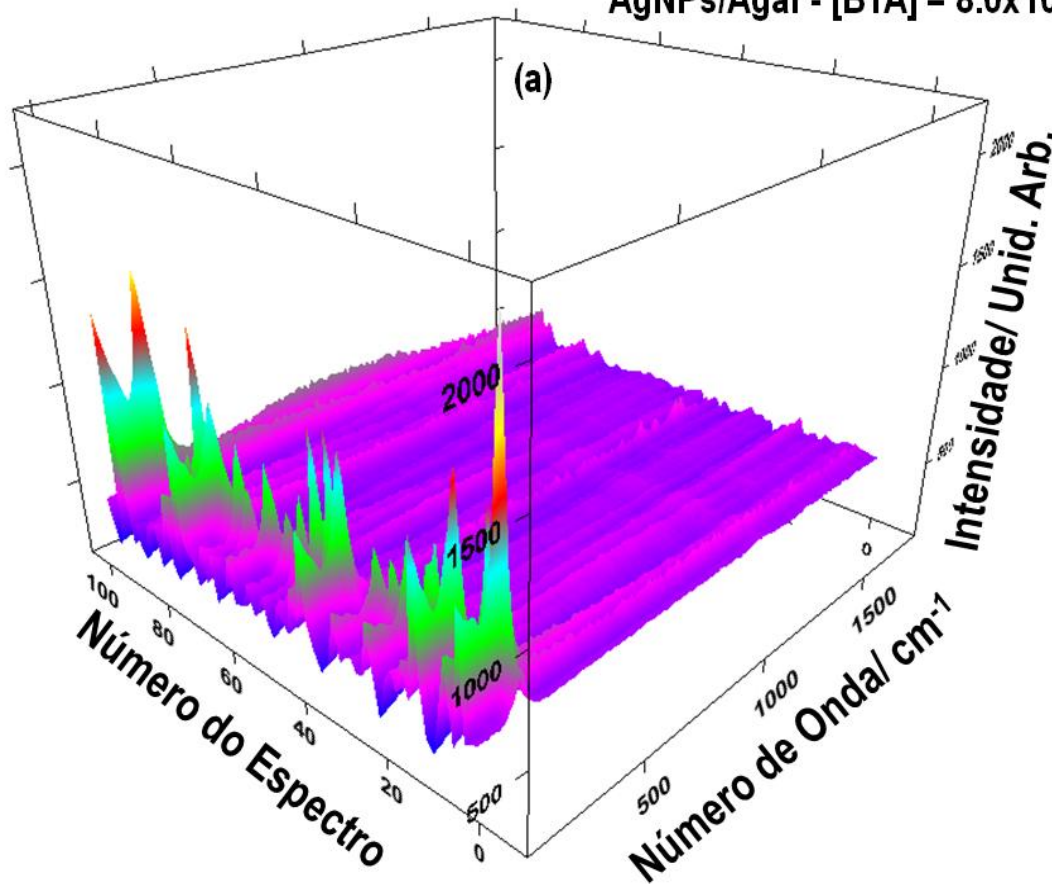


Figura 48: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados de uma das réplicas da Fig. 47(b).

Nos casos da R6G e CV, os deslocamentos observados foram interpretados como sendo devido à formação de pares iônicos dos corantes com o cloreto adsorvido nos sítios SERS-ativos. Entretanto, no caso do BTA isso não acontece pelo fato do BTA ser a forma aniônica do BTAH.

No espectro Raman do benzotriazolato (BTAH em solução alcalina) o modo relacionado à respiração do anel triazólico, que corresponde ao estiramento simétrico $N=N=N$, é observado em 1165 cm^{-1} .^{117,118} Para a forma neutra do benzotriazol e para o complexo $[Cu(I)CIBTAH_4]_n$ esse modo é observado em torno de 1214 e 1210 cm^{-1} , respectivamente.^{116,117,119} Nos complexos poliméricos, $[Cu(I)BTA]_n$, $[Ag(I)BTA]_n$ e $[Zn(II)BTA]_n$ esse modo é observado a 1183 cm^{-1} , 1195 e 1180 cm^{-1} , respectivamente.^{116,117,119}

Para concentrações de BTA mais altas, assim como para os demais adsorbatos, observa-se o recobrimento total da superfície, entretanto os sinais observados, conforme dito anteriormente, não são tão fortes quanto para os demais adsorbatos. A imagem da esquerda na Fig. 49(a) mostra o mapeamento do sinal SERS em ca. 784 cm^{-1} , mostrando que a superfície está praticamente toda recoberta por BTA que corrobora com a formação da monocamada, assim como a imagem direita da Fig. 49(b) indica que a área superficial analisada era SERS-ativa. Através da representação 3D dos

100 espectros que constituem uma réplica (Fig. 50) é possível visualizar, de forma mais clara, a formação da monocamada mesmo com os sinais menos intensos em comparação aos demais.

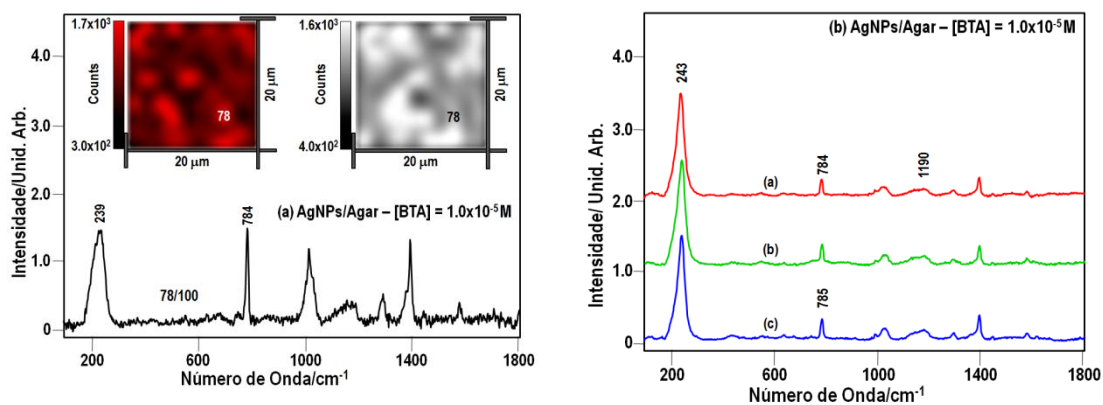


Figura 49: Espectros SERS de AgNPs/Agar com BTA $1,0 \times 10^{-5}$ M. (a) espectros individuais são indicados pelo número de um total de 100 espectros. A imagem do lado esquerdo representa a distribuição superficial da intensidade do sinal em ca. 784 cm^{-1} e a imagem do lado direito representa a distribuição superficial da intensidade do sinal em ca. 239 cm^{-1} . (b) Médias de 100 espectros: (1), (2) e (3) indicam as triplicatas.

O espectro 78/100 da Fig. 49(a) e os espectros das médias, Fig. 49(b), mostram um sinal SERS em 1190 cm^{-1} . Esses espectros são bem semelhantes aqueles observados para BTA adsorvido em eletrodos de Ag¹¹⁷ e em Ag sol em solução alcalina.¹¹⁸ A estrutura proposta para BTA em um eletrodo de prata SERS-ativo é semelhante àquela proposta para cobre, ou seja, ocorre a formação de um filme polimérico de $[\text{Ag}(\text{I})\text{BTA}]_n$, pois os espectros SERS do BTA adsorvidos em prata são muito semelhantes ao espectro Raman do complexo polimérico $[\text{Ag}(\text{I})\text{BTA}]_n$.¹¹⁷ A formação de um complexo $[\text{Ag}(\text{I})\text{BTA}]_n$ em substrato Ag/sol SERS-ativo também foi proposto e mostrado ser consistente com cálculos DFT.¹²⁰ Assim, os espectros SERS da Fig. 49 são interpretados como sendo referentes ao BTA formando um filme polimérico de $[\text{Ag}(\text{I})\text{BTA}]_n$ na superfície das AgNPs. Portanto, o sinal SERS em ca. $239\text{-}244 \text{ cm}^{-1}$ se deve ao modo de estiramento Ag-N do BTA no complexo polimérico e não ao modo de estiramento Ag-Cl. Retornando ao caso do MB, em que o sinal SERS em ca. 240 cm^{-1} apresenta comportamento diferente ao observado para R6G e CV, interpretamos como o MB adsorvendo quimicamente sobre a superfície das AgNPs, via formação de uma ligação química com a Ag e não via formação de par iônico com o Cl⁻. Essa interpretação é suportada pelo fato de o MB apresentar uma energia livre de adsorção maior do que as observadas para R6G e CV.

AgNPs/Agar - [BTA] = 1.0×10^{-5} M

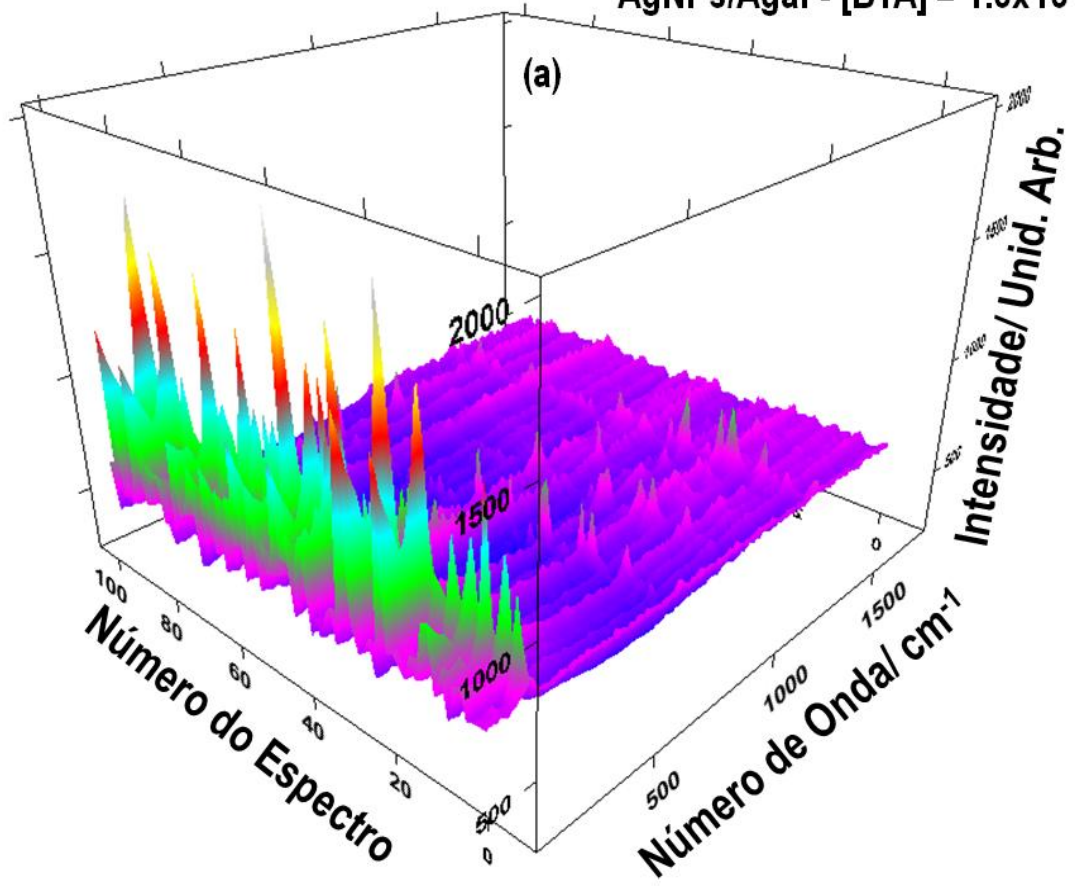


Figura 50: Representação 3D de 100 espectros correspondentes aos dados usados na Fig. 49 (b).

CAPÍTULO 5
CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

O procedimento sintético desenvolvido neste trabalho para a produção de AgNPs dispersas em gel de agarose (AgNPs/Agar) mostrou ser um processo de fácil operação, relativamente rápido e capaz de gerar AgNPs de forma reprodutível. Além disso, o gel preparado tem longa durabilidade e boa estabilidade, podendo ser utilizado meses após o seu preparo. Entretanto, para estudos SERS, o gel deve ser exposto ao adsorbato logo após o preparo, pois o gel ainda encontra-se hidratado, o que permite a difusão das moléculas de adsorbato. Cabe destacar também, que outra característica do material obtido é a sua biodegradabilidade.

A caracterização das AgNPs, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), mostrou que as AgNPs/Agar obtidas apresentam diâmetro médio de 19 nm e com maior número de agregados do que as AgNPs/Coloide com diâmetro médio de 8 nm. Contudo, ambos substratos apresentaram AgNPs formando agregados, os quais são importantes para investigações SERS, pois os maiores fatores de intensificação Raman são observados para moléculas adsorvidas nas regiões de fronteira entre nanopartículas agregadas, o famosos “*hot spots*”.

Os espectros UV-vis dos AgNPs/Coloide e AgNP/Agar confirmaram os dados de MET, mostrando que as AgNPs/Agar apresentam ressonâncias de SPP na região próxima a 600 nm, indicando a formação de agregados maiores.

Os espectros SERS obtidos da R6G adsorvida no substrato AgNPs/Coloide e obtidos da R6G adsorvida no substrato AgNPs/Agar permite concluir que os sinais do adsorbato no substrato AgNPs/Agar são até 10 vezes mais intensos que os sinais do adsorbato no substrato AgNPs/Coloide, mostrando-se um ótimo substrato SERS-ativo.

As isotermas de adsorção obtidas através da variação da intensidade SERS para a R6G adsorvida com a concentração desta em solução, nos dois tipos de substrato, mostraram-se semelhantes, o que levou ao emprego do método para a obtenção das isotermas de adsorção das outras espécies investigadas (MB, CV e BTA) em AgNPs/Agar.

O estudo do comportamento dos adsorbatos R6G (adsorvida nos substratos AgNPs/Coloide e AgNPs/Agar), MB, CV e BTA (adsorvidos no substrato AgNPs/Agar), com relação à variação da intensidade SERS em função da concentração dos adsorbatos, mostrou que a intensidade SERS tende a um valor limite de acordo com o aumento da concentração dos adsorbatos, o que indica a formação de uma monocamada dos compostos alvo recobrimo a superfície analisada. No caso do MB foram observados sinais SERRS do monômero e do dímero. Sendo assim, foi possível descrever o comportamento de adsorção dos compostos seguindo modelos de isotermas de adsorção. Para todos os adsorbatos investigados, a isoterma de Langmuir mostrou a que melhor se ajustava aos dados experimentais, com energias livres de adsorção características de adsorção química ($< -30 \text{ kJ.mol}^{-1}$).

Os resultados SERS/SERRS das espécies investigadas mostraram também que a R6G e o CV adsorvem sobre os sítios SERS-ativos formando pares iônicos com o Cl^- adsorvido (usado para

induzir a agregação das AgNPs). No caso do BTA a adsorção ocorre via formação de um composto polimérico, pela formação de ligação entre átomos de Ag e o N do anel triazólico. No caso do MB a adsorção se dá, provavelmente, via formação de ligação entre a Ag e o S do anel tiazínico.

Para todos os casos, em baixas concentrações, tais como $1,0 \times 10^{-8}$ M, os espectros individuais retirados de conjuntos contendo 100 espectros (réplicas) apresentaram intensidades relativas diferentes quando comparados com as médias espectrais de cada réplica, evidenciando assim que estes espectros são obtidos de moléculas únicas adsorvidas (SMD – *single molecule detection*) nas AgNPs/Agar ou AgNPs/Coloide. Para concentrações mais altas, tais como $2,0 \times 10^{-6}$ M, os espectros individuais retirados de conjuntos contendo 100 espectros (réplicas) apresentaram intensidades relativas semelhantes às médias espectrais de cada réplica, mostrando que, neste caso, os espectros individuais já representam uma média das intensidades SERS das moléculas adsorvidas nos sítios SERS-ativos atingidos pela radiação laser. Finalmente, pode-se concluir que o substrato SERS-ativo AgNPs/Agar mostrou-se promissor na detecção de substâncias com excitação em diversas regiões do espectro visível, uma vez que as AgNPs/Agar promoveram a intensificação do sinal Raman de substâncias fora de ressonância, em pré-ressonância e em ressonância com a radiação laser, o que as torna um poderoso substrato SERS-ativo, que permite a detecção em nível de uma molécula (SMD).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

- [1] Sala, O., *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. **2008**, 2ª Ed., São Paulo, UNESP.
- [2] Harris, D. C.; Bertolucci, M. D.; *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*. **1989**, New York, Oxford University Press.
- [3] Compagnini, G.; *Journal of Raman Spectroscopy*. **2008**, vol. 39, pp. 131-133. DOI: 10.1002/jrs.1913.
- [4] Thompson, T.; *Laser Focus World*. Editorial Digest.
- [5] Opilik, L.; Schmid, T.; Zenobi, R.; *Annual Review of Analytical Chemistry*, **2003**, vol. 6, pp. 379-398.
- [6] Bansal, C.; Botta, R.; Upender, G.; Sthyavathi, R.; Rao, D. N.; *Materials Chemistry Chemistry and Physics*. **2013**, vol. 137, pp. 699-703. DOI: 10.1016/j.metchemphys.2012.10.022.
- [7] Creighton, J. A.; Albrecht, M. G.; *Journal of the American Chemistry Society*. **1977**, vol. 99(15), pp. 5215-5217.
- [8] Schatz, G. C.; *Accounts of Chemical Research*. **1984**, vol. 17, pp. 370.
- [9] Otto, A.; Mrozek, I.; Grabhorn, H.; Akemann, W.; *Journal of Physics-Condensed Matter*. **1992**, vol. 4, pp. 1143.
- [10] Campion, A.; Kambhampati, P.; *Chemical Society Reviews*. **1998**, vol. 27, pp. 241-250.
- [11] Junior, O. N. O.; Aroca, R. F.; Constantino, C. J. L.; Alessio, P.; *Journal of Chilean Chemical Society*. **2010**, vol. 55, n. 4, pp. 469-478.
- [12] Ru, E. C. L.; Etchegoin, P. G.; *Annual Review of Physical Chemistry*. **2012**, vol. 63, pp. 65-87. DOI: 10.1146/annurev-physchem-032511-143757.
- [13] Ru, E. C. L.; Etchegoin, P. G.; *Materials Research Society*. **2013**, vol. 38, pp. 631-640. DOI: 10.1557/mrs.2013.158.
- [14] Long, Y.-T.; Fossey, J. S.; Qu, L.-L.; Li, D.-W.; Zhai, W.-L.; *Nanoscale*. **2012**, vol. 4, pp. 137-142. DOI: 10.1039/c1nr10956a.
- [15] Alvarez-Puebla, R. A.; Aldeanueva-Potel, P.; Faucher, E.; Liz-Marzán, L. M.; Brust, M.; *Analytical Chemistry*. **2009**, vol. 81, no. 22, pp. 9233-9238. DOI: 10.1021/ac901333c.
- [16] Ayyad, O.; Muñoz-Rojas, D.; Oró-Solé, J.; Gómez-Romero, P.; *Journal of Nanoparticle Research*. **2010**, vol. 12, pp. 337-345. DOI: 10.1007/s11051-009-9620-3.
- [17] Lofrumento, C.; Ricci, M.; Platania, E.; Becucci, M.; Castellucci, E.; *Journal of Raman Spectroscopy*. **2013**, vol. 44, pp. 47-54. DOI: 10.1002/jrs.4162.
- [18] Saha, B.; Raza, A.; *Forensic Science International*. **2013**, vol. 233, pp. 21-27. DOI: 10.1016/j.forsciint.2013.08.004.

- [19] Long, D. A.; *Journal of Raman Spectroscopy*. **2008**, vol. 39, pp. 316-321. DOI: 10.1002/jrs.1948.
- [20] Masters, B. R.; *Optics & Photonics News*. **2009**, vol. 20(3), pp. 40-45.
- [21] Raman, C. V.; Krishnan, K. S.; *Nature*. **1928**, vol. 121, pp. 501-502. DOI: 10.1038/121501c0.
- [22] Das, R. S.; Agrawal, Y. K.; *Vibrational Espectroscopy*. **2011**, vol. 57, pp. 163-176. DOI: 10.1016/j.vibspec.2011.08.003.
- [23] Chang, H.-C.; Lin, C.-C.; Kuo, M.-T.; *Journal of Medical and Biological Engeneering*. **2010**, vol. 30, no. 6, pp. 343-354. DOI: 10.5405/jmbe.846.
- [24] Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J.; *Chemical Physics Letter*. **1974**, vol. 26, pp. 163-166.
- [25] Van Duyne, R. P.; Jeanmaire, D. L.; *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **1977**, vol. 84, pp. 1-20.
- [26] Ahmad, H.; Kronfeldt, H.-D.; *marine Science*. **2013**, vol. 3(1), pp. 1-8. DOI: 10.5923/j.ms.20130301.01.
- [27] Kolomijeca, A.; Kwon, Y.-H.; Sowoidnich, K.; Prien, R. D.; Schulz-Bull, D. E.; Kronfeldt, H.-D.; *Proceedings of Twenty-first: International Offshore and Polar Engineering Conference*. **2011**.
- [28] Zhao, B.; Ozaki, Y.; Xie, Y.; Wang, X.; Han, X.; Xue, X.; Ji, W.; Qi, Z.; Liu, J.; *The Royal Society of Chemistry, Analyst*. **2010**, vol. 135, pp. 1389-1394. DOI: 10.1039/c0an00076k.
- [29] Zhang, J.; Fang, Y.; Ling, X.; Xie, L.; *Journal of American Chemical Society*. **2009**, vol. 131, pp. 9890-9891.
- [30] Cyrankiewicz, M.; Wybranowski, T.; Kruszewski, S.; *Journal of Physics, Conference Series*. **2013**, vol. 79. DOI: 10.1088/1742-6596/79/1//012013.
- [31] Vo-Dinh, T.; *Trends in Analytical Chemistry*. **1998**, vol. 17, no. 8+9, pp. 557-582.
- [32] Smith, W. E.; McNay, G.; Eustace, D.; *Applied Spectroscopy*. **2011**, vol. 65, no. 8, pp. 825-837. DOI: 10.1366/11-06365.
- [33] Rubim, J. C.; Corio, P.; Ribeiro, M. C. C.; Matz, M.; *Journal of Physical Chemistry*. **1995**, vol. 99, no. 43, pp. 15765-15774. DOI: 10.1021/j100043a013.
- [34] Schantz, G. C.; Van Duine, R. P.; (Eds. Chalmers, J. M.; Griffiths, P. R.) *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. **2002**.
- [35] Hayner, C. L.; McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P.; *Analytical Chemistry*. **2005**, pp. 338A-346A.
- [36] Costa, L. A. F.; Dissertação, Universidade de Brasília. **2011**.
- [37] Kneipp, K.; Kneipp, H.; Kartha, V. B.; Manoharam, R.; Deinum, G.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S.; *Physical Review E*. **1998**, vol. 57(6), pp. R6281-R6284. DOI: 10.1103/PhysRevE.57.R6281.

- [38] Gresillon, S.; Aigouy, L.; Boccara, A.C.; Rivoal, J.C.; Quelin, X.; Desmarest, C.; Gadenne, P.; Shubin, V.A.; Sarychev, A.K.; Shalaev, V. M. *Physical Review Letters*. **1999**, vol. 82, pp. 4520-4523. DOI: 10.1103/PhysRevLett.82.4520.
- [39] Michaels, A.M.; Jiang, J.; Brus, L. *Journal of Physical Chemistry B*. **2000**, vol. 104, pp. 11965-11971. DOI: 10.1021/jp0025476.
- [40] Svedberg, F.; Li, Z.; Xu, H.; Käll, M. *Nanomaterials Letters*. **2006**, vol. 6, pp. 2639-2641. DOI: 10.1021/nl062101m.
- [41] Camargo, P.H.C.; Rycenga, M.; Au, L.; Xia, Y. *Angewandte Chemie International Edition*. **2009**, vol. 48, pp. 2180-2184. DOI: 10.1002/anie.200806139.
- [42] Wustholz, K. L.; Henry, A.-I.; McMahon, J. M.; Freeman, R. G.; Valley, N.; Piotti, M. E.; Natan, M.J. Schatz, G.C.; Van Duyne, R.P. *Journal of the American Chemical Society*. **2010**, vol. 132, pp. 10903–10910. DOI: 10.1021/ja104174m.
- [43] Rubim, J. C.; Aroca, R. F. *Journal of Physical Chemistry*. **2008**, vol. 10, pp. 5412–5418. DOI: 10.1039/b804950e.
- [44] Santos, D. P.; Temperini, M. L. A.; Brolo, A. G. *Journal of the American Chemical Society*. **2012**, vol. 134, n. 32, pp. 13492–13500. DOI: 10.1021/ja305580t.
- [45] Hug, Y. S.; Chung, A. J.; Erickson, D.; *Microfluid Nanofluid*. **2009**, vol. 6, pp. 285-297.
- [46] Sakamoto, T.; Ohishi, K.; Hayashi, S.-I.; Fujii, M.; *Surface and Interface Analysis*. **2013**, vol. 45, pp. 1309-1312. DOI: 10.1002/sia.5284.
- [47] Luong, T. Q. N.; Cao, T. A.; Dao, T. C.; *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. **2013**, vol. 4, pp. 015018-015022.
- [48] Cai, T.; Gu, H.; Yuan, X.; Liu, F.; *Journal of Physics, Conference Series*. **2011**, vol. 277.
- [49] Bowden, S. A.; Wilson, R.; Cooper, J. M.; Parnell, J.; *Astrobiology*. **2009**, vol. 10, no. 6, pp. 629-641. DOI: 10.1089/ast.2009.0435.
- [50] Shamsaie, A.; Heim, J.; Yanik, A.; Irudayaraj, J.; *Chemical Physics Letters*. **2008**, vol. 461, no. (1-3), pp. 131-135. DOI: 10.1016/j.cplett.2008.06.064.
- [51] Ravindranath, S. P.; Henne, K. L.; Thompson, D. K.; Irudayaraj, J.; *PLoS One*. Vol. 6 (2), e16634. DOI: 10.1371/journal.pone.0016634.
- [52] Whitney, A. V.; Van Duyne, R. P.; Casadio, F.; *Journal of Raman Spectroscopy*. **2006**, vol. 37, pp. 993-1002. DOI: 10.1002/jrs.1576.
- [53] Zhao, B.; Ozaki, Y.; Xie, Y.; Xu, W.; Han, X.; Song, W.; Ruan, W.; *Journal of Raman Spectroscopy*. **2001**, vol. 42, pp. 945-950. DOI: 10.1002/jrs.2818.
- [54] Rinnert, E.; Péron, O.; Lehaitre, M.; Colas, F.; Compère, C.; *Chemical and Biological Sensing Technologies VI, Proc. Of SPIE*. **2009**, 7312. DOI: 10.1117/12.818641.

- [55] Cai, Q.; Sheng, P.; Wu, S.; Bao, L.; Wang, X.; Chen, Z.; *New Journal of Chemistry*. **2012**, vol. 36, pp. 2501-2505. DOI: 10.1039/c2nj40604g.
- [56] Rinnert, E.; Péron, O.; Lehaitre, M.; Crassous, P.; Compère, C.; *Talanta*. **2009**, vol. 79 (2), pp. 199-204. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.03.043.
- [57] Du, Y. P.; Wang, X.; Sui, T.; Cao, P.; Geng, J. P.; Ren, Y. L.; Li, Q. Q.; Tang, H. R.; *Chinese Chemical Letters*. **2011**, vol. 22, pp. 1477-1480. DOI: 10.1016/J.ccllet.2011.07.013.
- [58] Chen, R.; Li, Z.; Huang, Z.; Chen, G.; Lin, D.; Xi, G.; Xen, Y.; Lin, H.; Lei, J.; *Journal of Physics: Conference Series*. **2001**, vol. 277. DOI: 10.1088/1742-6596/277/1/012014.
- [59] Lin, M.; He, L.; Awika, J.; Yang, L.; Ledowx, D. R.; Li, H.; Mustapha, A.; *Journal of Food Science*. **2008**, vol. 73, no. 8, pp. T129-T134. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00901.x.
- [60] Pei, L.; Huang, Y.; Li, C.; Zhang, Y.; Rasco, B. A.; Lai, K.; *Journal of Nanomaterials*. **2014**, vol. 2014, pp. 1-8. DOI: 10.1155/2014/730915.
- [61] Farquharson, S.; Shende, C.; Sen Gupta, A.; Huang, H.; Inscore, F.; *Pharmaceutics*. **2011**, vol. 3(3), pp. 425-439. DOI: 10.3390/pharmaceutics3030425.
- [62] Raju, N. R. C.; *Materials Letters*. **2014**, vol. 130, pp. 274-276. DOI: 10.1016/j.matlet.2014.050137.
- [63] Miao, L.; Kang, Y.; Si, M.; Zhu, Y.; Xu, G.; *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2013**, vol. 108, pp. 177-180. DOI: 10.1016/j.saa.2013.01.098.
- [64] Orville-Thomas, W. J.; Sala, O.; Gutz, I. G. R.; Rubim, J.; *Journal of Molecular Structure*. **1983**, vol. 100, pp. 571-583.
- [65] Kapoor, S.; Venkateswaran, S.; Thomas, S.; D'Cunha, R.; Mukherjee, T.; *Spectrochimica Acta Part A*. **2004**, vol. 60, pp. 25-29.
- [66] Ishikawa, M.; Maruyama, Y.; YE, J.-Y.; Futamata, M.; *Journal of Biological Physics*. **2002**, vol. 28, pp. 573-585.
- [67] Kneipp, K.; Kneipp, H.; Kartha, V. B.; Manoharam, R.; Deinum, G.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S.; *Physical Review E*. **1998**, vol. 57(6), pp. R6281-R6284. DOI: 10.1103/PhysRevE.57.R6281.
- [68] Käll, M.; Xu, H.; Bjerneld, E. J.; Börjesson, L.; *Physical Review Letters*. **1999**, vol. 83, no. 21, pp. 4357-4360.
- [69] Wang, Y.; Irudayaraj, J.; *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **2012**, vol. 368(1611). DOI: 10.1098/rstb.2012.0026.
- [70] Kneipp, K.; Kneipp, H.; Deinum, G.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M.; *Applied Spectroscopy*. **1998**, vol. 52, no. 2, pp. 175-178.
- [71] Brus, L. E.; Nirmal, M.; Michaels, A. M.; *Journal of American Chemistry Society*. **1999**, vol. 121, pp. 9932-9939.

- [72] Van Duyne, R. P.; Schantz, G. C.; Scheidt, K. A.; Phillips, E.; Wustholz, K. L.; Valley, N.; Ringe, E.; Kleinman, S. L.; *Journal of American Chemistry Society*. **2011**, vol. 133, pp. 4115-4122
- [73] Kneipp, K.; Kneipp, H.; Wang, Y.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S.; *Physics Review Letters*. **1997**, vol. 78(9), pp. 1667-1670. DOI: 10.1103/PhysRevLett.78.1667.
- [74] Agar ou agar-agar, o ficocolóide mais antigo; *Aditivos & Ingredientes*. pp. 31-39. Disponível em: www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/87.pdf.
- [75] Santos, J. P.; Dissertação, Universidade Estadual de Feira de Santana. **2011**.
- [76] Saha, B.; Raza, A.; *Forensic Science International*. **2014**, vol. 237, pp. e42-e46. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.01.019.
- [77] Braun, G.; Guarrotxena, N.; *Journal Nanoparticle Research*. **2012**, vol. 14(1199), pp. 1-8. DOI: 10.1007/s11051-012-1199-4.
- [78] Keating, M.; Chen, Y.; Larmour, I. A.; Faulds, K.; Graham, D.; *Measurement Science and Technology*. **2012**, vol. 23. pp. 1-9 DOI: 10.1088/0957-0233/23/8/084006.
- [79] Abell, C.; Liz-Marzán, L. M.; Alvarez-Puebla, R. A.; Huck, W. T. S.; Fischlechner, M.; Auguie, B.; Abalde-Cela, S.; *Soft Matter*. **2011**, vol. 7, pp. 1321-1325. DOI: 10.1039/c0sm00601.
- [80] Kattumuri, V.; Chandrasekhar, M.; Guha, F.; Raghuraman, K.; Katti, K. V.; Ghosh, K.; Patel, R. J.; *Applied Physics Letters*. **2006**, vol. 88, pp. 153114-1-153114-3. DOI: 10.1063/1.2192573.
- [81] Yang, W.; Li, J.; Li, M.; Jing, J.; Ji, X.; Dong, X.; *Journal of Physical Chemistry C*. **2010**, vol 114, n. 5, pp. 2070-2074. DOI: 10.1021/jp909964k.
- [82] Lee, P. C.; Meisel, D.; *Journal of Physical Chemistry*. **1982**, vol. 86, n. 17, pp. 3391-3395. DOI: 10.1021/j100214a025.
- [83] Farhadi, K.; Hajizadeh, S.; Forough, M.; Sabzi, R. E.; *Analytical Methods*. **2011**, vol. 3, pp. 2599-2603. DOI: 10.1039/c1ay05567d.
- [84] Silver; *Mindat.org*. Disponível em: www.mindat.org/min-3664.html.
- [85] Wolf, D. E.; *Theory Tutorials*. pp. 1-3. Disponível em: www.fcsxpert.com/classroom/theory/pdfs/fcs_confocal.pdf
- [86] Etchegoin, P. G.; Ru, E. C. L.; Blackie, E. J.; *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, vol. 131, n. 40, pp. 14466-14472. DOI: 10.1021/ja905319w.
- [87] Maher, R. C.; Dalley, M.; Ru, E. C. L.; Cohen, L. F.; Etchegoin, P. G.; Hartigan, H.; Brown, R. J. C.; Milton, M. J. T.; *The Journal of Chemical Physics*. **2004**, vol. 121, pp. 8901. DOI: 10.1063/1.1804178.
- [88] Etchegoin, P. G.; Ru, E. C. L.; Bohn, J. E.; *The Journal of Physical Chemistry C*. **2010**, vol. 114, n. 16, pp. 7330-7335. DOI: 10.1021/jp908990v.
- [89] Freundlich, H. M. F. Z.; *Physical Chemistry*. **1906**, vol. 57A, pp. 385.

- [90] Langmuir, I.; *Journal of the American Chemical Society*. **1918**, vol. 40, pp. 1361.
- [91] Frumkin, A. N. Z.; *Physical Chemistry*. **1925**, vol. 116, pp. 466.
- [92] Olson, L. G.; Harris, J. M.; *Applied Spectroscopy*. **2008**, vol. 62, pp. 149.
- [93] Selwyn, J. E.; Steinfel, J.; *Journal of Physical Chemistry*. **1972**, vol. 76, pp. 762.
- [94] Lu, Y.; Penzkofer, A.; *Chemical Physics*. **1986**, vol. 107, pp. 175.
- [95] Spencer, W.; Sutter, J. R.; *Journal of Physical Chemistry*. **1979**, vol. 83, pp. 1573.
- [96] Lueck, H. B.; Rice, B. L.; McHale, J. L.; *Spectrochimica Acta Part a – Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **1992**, vol. 48, pp. 819.
- [97] Bujdak, J.; Lyi, N.; Fujita, T.; *Clay Minerals*. **2002**, vol. 37, pp. 121.
- [98] Nicolai, S. H. A.; Rubim, J. C.; *Langmuir*. **2003**, vol. 19, pp. 4291.
- [99] Naujok, R. R.; Duevel, R. V.; Corn, R. M.; *Langmuir*. **1993**, vol. 9, pp. 1771.
- [100] Nicolai, S. H. D.; Rodrigues, P. R. P.; Agostinho, S. M. L.; Rubim, J. C.; *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **2002**, vol. 527, pp. 103.
- [101] Wang, S. B.; Li, H.; Xu, L. Y. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2006**, vol. 295, pp. 71.
- [102] Dubey, S. P.; Dwivedi, A. D.; Kim, I. C.; Sillanpaa, M.; Kwon, Y. N.; Lee, C. *Chemical Engineering Journal*. **2014**, vol. 244, pp. 160.
- [103] Tripathi, A.; Emmons, E. D.; Fountain, A. W.; Guicheteau, J. A.; Moskovits, M.; Christesen, S. D. *Acs Nano*. **2015**, vol. 9, pp. 584.
- [104] Alessio, P.; Aoki, P. H. B.; Saez, J. A. D.; Rodriguez-Mendez, M. L.; Constantino, C. J. L.; *Royal Society of Chemistry Advances*. **2011**, vol. 1, pp. 211.
- [105] Pal, S.; Depero, L. E.; Alessandri, I.; *Nanotechnology*. **2010**, vol. 21.
- [106] Rubim, J. C.; Sousa, M. H.; Silva, J. C. O.; Tourinho, F. A.; *Brazilian Journal of Physics*. **2001**, vol. 31, pp. 402.
- [107] Alessandri, I.; Depero, L. E.; *Acs Applied Materials & Interfaces*. **2010**, vol. 2, pp. 594.
- [108] Rabinowitch, E.; Epstein, L. F.; *Journal of the American Chemical Society*. **1941**, vol. 63, pp. 69.
- [109] Canamares, M. V.; Chenal, C.; Birke, R. L.; Lombardi, J. R.; *Journal of Physical Chemistry C*. **2008**, 112, 20295.
- [110] Sackmann, M.; Bom, S.; Balster, T.; Materny, A.; *Journal of Raman Spectroscopy*. **2007**, vol. 38, pp. 277.
- [111] Su, L.; Jia, W. Z.; Manuzzi, D. P.; Zhang, L. C.; Li, X. P.; Gu, Z. Y.; Lei, Y.; *Royal Society of Chemistry Advances*. **2012**, vol. 2, pp. 1439.
- [112] Fan, H. F.; Li, F. P.; Zare, R. N.; Lin, K. C.; *Analytical Chemistry*. **2007**, vol. 79, pp. 3654.

- [113] Jeanmaire, D. L.; Vanduyne, R. P.; *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **1977**, vol. 84, pp. 1.
- [114] Hansen, L. D.; West, B. D.; Baca, E. J.; Blank, C. L.; *Journal of the American Chemical Society*. **1968**, vol. 90, pp. 6588.
- [115] Rubim, J. C.; Gutz, I. G.; Sala, O.; *Journal of Molecular Structure*. **1980**, vol. 100, pp. 571.
- [116] Dacosta, S.; Agostinho, S. M. L.; Rubim, J. C.; *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **1990**, vol. 295, pp. 203.
- [117] Rubim, J. C.; Gutz, I. G. R.; Sala, O.; *Journal of Molecular Structure*. **1983**, vol. 101, pp. 1.
- [118] Thomas, S.; Venkateswaran, S.; Kapoor, S.; D'Cunha, R.; Mukherjee, T.; *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2004**, vol. 60, pp. 25.
- [119] Rubim, J. C.; Gutz, I. G. R.; Sala, O.; Orvillethomas, W. J.; *Journal of Molecular Structure*. **1983**, vol. 100, pp. 571.
- [120] Naumov, S.; Kapoor, S.; Thomas, S.; Venkateswaran, S.; Mukherjee, T. *Journal of Molecular Structure-Theochem*. **2004**, vol. 685, pp. 127.