UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

DIEGO PEREIRA DOS SANTOS

Espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS) no regime de detecção de uma molécula

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
09/04/2013

DIEGO PEREIRA DOS SANTOS

Espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS) no regime de detecção de uma molécula

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Doutor em Química

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Laudelina Arruda Temperini

São Paulo
2013

Dedicatória

À minha mãe Vânia Maria Pereira da Silva por todo amor, carinho e dedicação sem os quais nada teria conquistado. Obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, minha mãe Vânia, minha irmã Géssica, minha esposa Deborah e Marcos pelo apoio em todos os momentos da minha vida e por me encorajarem a prosseguir e me guiarem no melhor caminho.

Agradeço a Deus por tudo, principalmente pela força nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Professora Dra. Marcia Laudelina Arruda Temperini, pela orientação e oportunidade de continuar minha formação acadêmica como seu aluno e pela amizade. Agradeço também ao Prof. Dr. Alexandre Brolo, da University of Victoria, Victoria, Canadá, por me aceitar como seu aluno ao longo de 1 ano naquela instituição. Aos dois orientadores que tive neste doutorado, agredeço profundamente por todo ensinamento e paciência.

A todos os membros do Laboratório de Espectroscopia Molecular do IQUSP (LEM-IQUSP). A cada um dos professores pela ajuda, Prof. Dr. Oswaldo Sala, Profa. Dra. Dalva L. A. de Faria, Profa. Dr. Paulo Sérgio Santos, Prof. Dr. Mauro C. C. Ribeiro, Profa. Dra. Paola Corio, Prof. Dr. Rômulo A. Ando e Prof. Dr. Yoshio Kawano. Aos colegas, alunos e ex-aluno em especial aos Profs. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade e Dr. Antônio Carlos Sant'Ana , e aos técnicos Dna. Elzita, Paulinho, Nivaldo, Marcelo P. e Marco Antônio por toda ajuda.

Às agências de fomento pelo apoio financeiro, ao CNPq pela bolsa de doutorado e à Fapesp pelo projeto temático do laboratório e pelo projeto CIAM (Colaboração Interamericana em Materiais) e ao ELAP (Emerging Leaders of America Program) pelas bolsas para estadia no Canadá. Aos Funcionários da seção de pós-graduação e do departamento financeiro do Instituto de Química da Universidade de São Paulo por todo apoio.

À todos os amigos que estiveram ao meu lado nesses anos, em especial minha querida Deborah, Fabio, Bruno, Camila, Michele, Jorge, Daniel, Thiago, Nathália, Kléster e ao Dr. Tércio.

RESUMO

Santos, D. P. **Espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS) no regime de detecção de uma molécula**. 2013. 222 p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nesta tese foi estudado o espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS) em regime de detecção de uma molécula em eletrodo de prata ativado por ciclos de oxidação e redução. Neste regime, de baixas concentrações, são observadas intensas flutuações de intensidade SERS as quais foram controladas neste substrato pela aplicação de potencial ao eletrodo, o que foi associado a alterações na concentração de moléculas adsorvidas na superfície do eletrodo. Além da dependência com o potencial aplicado, foram estudadas através de simulações Monte Carlo, a contribuição nestas flutuações da constante de adsorção das moléculas, do número de "*hot spots*" (regiões de altas intensificações SERS) e do tipo de "*hot spot*" (em termos de eficiência para detecção de espectros de uma molécula). Através destas simulações foram verificadas flutuações de intensidade muito semelhantes às observadas experimentalmente.

Além das flutuações de intensidade foram também observadas flutuações de intensidades relativas, como por exemplo, das relações de intensidades anti-Stokes/Stokes, as quais foram interpretadas segundo um modelo de ressonância, através do qual foi possível estimar as energias de ressonância nos "*hot spots*". Alguns dos resultados indicaram a contribuição de ressonâncias finas, as quais foram interpretadas como resultado de interferências entre ressonâncias de plasmon de superfície. Interferências como estas foram demonstradas através de simulações pelo método DDA ("*Discrete Dipole appoximation*") em modelos simples de "*hot spots*" formados por nanobastões de Au.

Palavras-chave: SERS, uma molécula, flutuações, DDA, Monte Carlo, nanopartículas.

ABSTRACT

Santos, D. P. **Surface-enhanced Raman scattering at single-molecule detection regime.** 2013. 222 p.. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this thesis it was studied surface-enhanced Raman scattering (SERS) at single-molecule detection on Ag electrode activated by oxidation and reduction cycles. At this low concentration limit it was observed strong SERS intensity fluctuations that were controlled by the applied potential to the electrode and this control was associated to changes in surface concentration of adsorbed molecules. Furthermore, it was studied through Monte Carlo simulations the influence of adsorption constant, number of "hot spots" (regions of high SERS enhancements) and type of "hot pot" (in terms of efficiency for single-molecule detection). With such simulations, it was verified fluctuations of SERS intensities very similar to experimental observations.

Besides absolute intensity fluctuations, we also observed fluctuations of relative intensities as, for instance, the. anti-Stokes to Stokes intensity ratios. These fluctuations were interpreted according to a resonance model, which made possible the estimative of resonance energies at the SERS "hot spots". Some of these results indicated the existence of sharp resonances that were interpreted as a result of interferences among surface plasmon resonances, which were demonstrated through DDA (Discrete Dipole Approximation) simulations in simple models of "hot spots" formed by Au nanorods.

Keywords: SERS, single-molecule, fluctuations, DDA, Monte Carlo, nanoparticles.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabelas

Tabela 1: Comparação entre secções de choque (σ) para diferentes processos de interação entre radiação eletromagnética e matéria. Esta tabela é adaptada da referência [6]. 33

Figuras

Figura 1: Modelo de transferência de carga entre estados do metal e da molécula adsorvida. 37

Figura 2: a) Parte real da função dielétrica $\varepsilon_1(\omega)$ em função do comprimento de onda. b) mesmo que em (a) para a parte imaginária da função dielétrica $\varepsilon_2(\omega)$..... 41

Figura 3: Para nanoesferas de Ag são apresentados a) Média na superfície da amplitude do campo local normalizado pela amplitude do campo elétrico da radiação incidente, onde se observa uma ressonância para comprimento de onda de 395 nm. b) Variação do comprimento de onda de ressonância ($\lambda_{Ressonância}$) em função do raio da nanoesfera. 43

Figura 4: Mapa dos fatores de intensificação (simulados pela Aproximação de Dipolos Discretos apresentada no Capítulo 4 desta tese) nas imediações de um dímero de nanoesferas (a = 25 nm) separadas por uma distância de ~1 nm. 46

Figura 5: Fórmulas estruturas da Rodamina 6G (a) e do Vermelho do Congo (b)..... 53

Figura 6: Espectros eletrônicos das moléculas R6G e CR..... 54

Figura 7: Espectros SERS de R6G em concentrações 500 nM e 20 nM em eletrodo de Ag ORC em potencial de circuito aberto (+0,04 V). 59

Figura 8: Perfis de intensidade SERS com tempo para a banda em *ca*. 1500 cm-1 da R6G em potencial de circuito aberto para as concentrações 500 nM (a) e 20 nM (b). 59

Figura 9: Componentes principais PC1 a PC4 para a sequência temporal de espectros de R6G em concentração 20 nM. 61

Figura 10: a) Coeficientes da combinação linear das componentes principais PC1 e PC2 (comp.1 e comp.2, respectivamente) para cada espectro da sequência temporal. b) Exemplo da reconstrução de um espectro original através da combinação linear das componentes principais PC1 e PC2. 62

Figura 11: Histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas pelo valor médio da distribuição para diferentes concentrações de R6G. Os espectros foram obtidos em eletrodo de Ag ORC em potencial de circuito aberto. 63

Figura 12: Histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas pelo valor médio da distribuição para soluções de R6G 5 μM e 500 nM em potencial de circuito aberto..... 66

Figura 13: Histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas pelo valor médio da distribuição para a banda em 1503 cm^{-1} da R6G em eletrodo de Ag ORC (concentração de R6G igual a 20nM). Os histogramas se referem a diferentes condições de potencial aplicado, como indicado na figura. 68

Figura 14: Espectros SERS de CR em concentrações 500 nM e 20 nM em potencial de circuito aberto (~0,4 V). 70

Figura 15: Coeficientes da combinação linear para as componentes principais PC1 e PC2 (comp.1 e comp.2, respectivamente) para o experimento "*bi-analyte*" em potencial de circuito aberto. 71

Figura 16: Componentes principais PC1 (a) e PC2 (b) para o experimento "*bi-analyte*" em potencial de circuito aberto. 72

Figura 17: Comparação entre espectros SERS no experimento "*bi-analyte*" com espectros SERS de R6G (a) e CR (b) em concentrações 500 nM (apresentados em preto). Potencial de circuito aberto..... 73

Figura 18: Histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas pelo valor médio da distribuição para as bandas em 1500 cm^{-1} da R6G (a) e 1590 cm^{-1} do CR (b) no experimento "*bi-analyte*" em potencial de circuito aberto. Em c) é apresentado o histograma de porcentagem de sinal corresponde a R6G. 73

Figura 19: Na primeira linha, em azul, são apresentados os histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas para a banda em *ca*. 1500 cm^{-1} da R6G no experimento "*bi-analyte*" para os potenciais -0,1 V (esquerda) e -0,2V (direita). Na segunda linha, em vermelho, o mesmo que na primeira, porém para a banda em 1591 cm^{-1} do CR. Na terceira linha, em cinza, são apresentados os histogramas de p_{R6G} para os potenciais -0,1 V (esquerda) e -0,2 V (direita). 75

Figura 20: Espectro Raman de CCl_4 nos lados anti-Stokes e Stokes. Potência 400 μW e tempo de acumulação 10s. 79

Figura 21: Fórmulas estruturais das moléculas BG (a) e CV (b). 85

Figura 22: Espectro SERRS médio (~1μM) de BG. 89

Figura 23: Histograma gerado a partir das medidas das relações anti-Stokes/Stokes (ρ) para uma sequência de 2000 espectros SERRS de BG (~1μM) obtidos em um mesmo ponto da superfície do eletrodo ativado 90

Figura 24: Dependência de ρ (ou K no caso de normalização pelo valor de ρ no Raman normal para o CCl_4) no regime de SERRS médio para BG com o potencial aplicado. 92

Figura 25: Espectros SERRS médio de BG em função do potencial aplicado. 93

Figura 26: a) Dependência das intensidades SERRS para as diferentes bandas indicadas na figura com o potencial aplicado. b) Modelo esquemático para a variação da condição de ressonância CE com o potencial aplicado. 94

Figura 27: a) Histograma de distribuição de ρ para a molécula BG em potencial de circuito aberto e condição de SERRS de uma molécula. b) Histogramas de distribuição de κ (ρ

normalizado pelo valor médio de ρ da Figura 23) para o BG em potencial de circuito aberto em condição de uma molécula (em preto) e em SERRS médio (azul). Em vermelho na figura são apresentados os valores da função de distribuição acumulada de probabilidade (CDF) para os dados no histograma em preto. 97

Figura 28: Em cada linha na coluna da esquerda são apresentadas figuras semelhantes à Figura 27b para os potenciais indicados. Na coluna da direita são apresentados exemplos de espectros correspondentes a altos valores de κ no histograma para a condição de uma molécula (em preto). 98

Figura 29: Histograma de distribuição de ρ na condição de SERRS de uma molécula para uma solução contendo BG e CV ("bi-analyte") utilizando-se como substrato SERS o coloide de Ag. 101

Figura 30: Espectro SERRS médio (~1μM) de CV em eletrodo de Ag ORC. 103

Figura 31: Histogramas de ρ na condição SERRS médio em potencial de circuito aberto para as moléculas BG (em verde) e CV (azul)..... 104

Figura 32: Espectros de absorção no UV-Vis para o BG (em verde) e CV (em azul) são apresentados na parte inferior da figura. Na parte superior são apresentados os modelos das bandas de ressonância CE para estas moléculas adsorvidas em Ag. As linhas verticais tracejadas se referem à radiação excitante em 632,8 nm (em vermelho), e às radiações espalhadas para o lado Stokes (vinho) e anti-Stokes (laranja) para um modo vibracional com frequência em ~215 cm^{-1}. 105

Figura 33: a) Modelo para as ressonâncias no perfil de intensificação SERRS com o comprimento de onda da radiação excitante no sistema metal-molécula, considerando um eletrodo ativado (ou outro substrato com alto grau de desordem). Na parte I são apresentados os fatores de intensificação eletromagnéticos EF_{EM}, em II o perfil do fator de químico CE e em III a média das ressonâncias em I. b) Fator de intensificação total no SERRS médio para o

sistema em (a). As linhas tracejadas indicam as posições da radiação excitante e espalhada para o Stokes e anti-Stokes para um modo com frequência vibracional em 215 cm^{-1}..... 107

Figura 34: a) Componentes principais PC1 e PC2 em função do número de onda correspondente a região Stokes em que os espectros foram obtidos. b) Componentes MPC1 e MPC2 obtidas a partir dos dados em (a). 109

Figura 35: Histograma de distribuição dos eventos de observação de espectros de uma molécula (BG ou CV), de eventos em que as duas moléculas são observadas simultaneamente e de eventos em que nenhum espectro foi observado. Para cada coluna dos eventos é apresentado um espectro característico observado..... 110

Figura 36: Histogramas de distribuição de κ para BG (a) e CV (b) na condição de uma molécula. 111

Figura 37: Espectros SERRS no regime de uma molécula selecionados da coluna "Ambos" da Figura 35, onde bandas das moléculas BG e CV são observadas simultaneamente. Os espectros foram tratados para remoção de fundo através do programa Cobra [81]. 112

Figura 38: Simulação pelo método DDA ("*Discrete Dipole Approximation*") do espectro de extinção e do perfil do fator de intensificação EF_{EM} em um "*hot spot*" formado por nanopartículas de Ag de raio 25 nm separadas por uma distância de, aproximadamente, 1nm (como mostrado no detalhe da figura). As simulações foram realizadas para as duas polarizações do campo elétrico da radiação excitante. A direção de propagação é a mesma do vetor de onda (k), perpendicular ao plano do papel. 114

Figura 39: Valores de $\kappa' = \kappa$ para os eventos com o lado anti-Stokes intensificado e $\kappa' = -1/\kappa$ para eventos com o Stokes intensificado para as moléculas BG e CV. No quadrante (I) são apresentados eventos em que o lado anti-Stokes é intensificado para as duas moléculas. Em (II) são apresentados eventos em que o anti-Stokes é intensificado para o BG e o Stokes para o CV. No quadrante (III) os eventos são de Stokes preferencialmente intensificado para ambas

as moléculas e em (IV) a molécula CV apresenta o lado anti-Stokes intensificado e o BG Stokes intensificado. 116

Figura 40: Modelo de ressonância para a intensificação dos lados anti-Stokes e Stokes. As curvas Lorentzianas em vermelho e azul descrevem ressonâncias para os lados Stokes e anti-Stokes, respectivamente. Os espectros SERRS apresentados (retirados do histograma da Figura 35) são para caracterizar as intensificações para cada lado do espectro SERRS devido a estas contribuições ressonantes. 117

Figura 41: Dependência de ρ_{EM} em função da largura (Γ_{EM}) obtida por meio da Eq. 52, utilizando frequência de ressonância igual a 16500 cm^{-1} 123

Figura 42: Simulação dos valores de K para diferentes frequências de ressonância e larguras de ressonância, como indicado. 125

Figura 43: Comparação entre o perfil da dependência de K com o potencial aplicado no regime de SERRS médio com os perfis da dependência de K_{CE} simulado em função da frequência de ressonância $\omega_{res,CE}$. 127

Figura 44: a) Dependência dos valores de κ com a energia de ressonância e largura de ressonância. b) Esquema para estimativa das energias de ressonância através da comparação entre os valores experimental e teórico. 128

Figura 45: Frequências de ressonância ($\omega_{res,EM}$) para cada valor de κ. 128

Figura 46: a) Ressonâncias determinadas na área mapeada do eletrodo ativado. b) Mapa das intensidades SERRS normalizadas para a banda ~200 cm^{-1} dos corantes na mesma área. ... 130

Figura 47: Sequências temporais de espectros obtidos com radiação excitante 632,8 nm na região anti-Stokes (a) e Stokes (c). Os espectros em (b) e (d) são os espectros mais intensos de (a) e (c). 140

Figura 48: Sequências temporais de espectros obtidos com radiação excitante 785 nm na região anti-Stokes (a) e Stokes (c). Os espectros em (b) e (d) são os espectros mais intensos de (a) e (c). 141

Figura 49: Sequência temporal de espectros obtidos com radiação excitante 632,8 nm na região anti-Stokes. 142

Figura 50: a) Espectro Raman normal de nitrobenzeno (líquido puro) nas regiões anti-Stokes e Stokes obtido para radiação excitante em 632,8 nm (potência ~0,4 mW). O detalhe da figura é uma ampliação da região anti-Stokes. b) Comparação entre as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes (ρ) para algumas bandas no espectro do nitrobenzeno (pontos pretos) e um ajuste (linha vermelha) segundo a Eq. 7 do Capítulo 3. O detalhe na figura mostra um espectro Raman normal na região anti-Stokes para o naftaleno com obtido com maior potência para a observação da banda em *ca*. 1590 cm^{-1} 143

Figura 51: Comparação entre os espectros de extinção experimental e simulados (Teoria de Mie e DDA) para nanopartículas de Au de 40 nm de diâmetro. 145

Figura 52: Comparação entre os espectros de extinção experimental e simulados (Teoria de Mie e DDA) para nanopartículas de Ag de 50 nm de diâmetro. 145

Figura 53: Comparação entre os espectros de extinção experimental e os simulados pela Teoria de Mie para nanopartículas de Ag de 50 nm e 110 nm de diâmetro..... 147

Figura 54: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) das nanopartículas de Ag sintetizadas pelo método de Lee e Meisel após agregação com KBr (10 mM). 148

Figura 55: Espectros de extinção simulados pelo método DDA para os dímeros formados por nanoesferas de 25 e 55 nm de raio, indicados na figura. 149

Figura 56: Simulações DDA para: a) Espectro de extinção para o dímero de nanoesferas de 25 nm (preto) separadas por 1 nm de distância e perfil do fator de intensificação do campo

elétrico ($|g(\omega_0)|$, onde $EF_{EM} \approx |g(\omega_0)|^4$) no "*hot spot*" (azul); b) Espectros de extinção para nanoesferas de prata 25 nm separadas por 1, 2 e 3 nm. 150

Figura 57: Espectro de extinção simulado pelo método DDA para o agregado de nanopartículas de Ag de 25 e 55 nm de raio esquematizada na figura. Em azul é apresentado um ajuste de curvas. 152

Figura 58: Mapas do fator de intensificação EF_{EM} em torno do agregado de nanoesferas simulados pelo método DDA. Os valores de EF_{EM} em cada mapa foram calculados considerando-se radiação excitante em 785 nm e espalhada em 697 nm (~1600 cm^{-1} para o lado anti-Stokes). Os resultados são apresentados para diferentes polarizações do campo elétrico da radiação excitante. 153

Figura 59: Espectro de extinção DDA para 1 nanobastão (esquematizado na figura). O espectro em detalhe corresponde a uma ampliação na região entre 400 e 600 nm. 156

Figura 60: a) Espectros de extinção simulados pelo DDA para agregados de 2, 3 e 4 nanobastões comparados ao espectro para 1 nanobastão. b) Mapa do fator de intensificação SERS (EF_{EM}) para o agregado de 4 nanobastões. 157

Figura 61: Diagrama de energia para interação dipolar entre excitons para a formação de dímeros de nanobastões. 159

Figura 62: a) Mapa do fator de intensificação SERS (EF_{EM}) para o agregado de 2 nanobastões interagindo lateralmente. b) vetores campo elétrico no interior dos nanobastões. c) ampliação de b) na região demarcada com o quadrado vermelho. 160

Figura 63: Simulação DDA para o espectro de extinção (preto) e para o fator de intensificação $|g(\omega_0)|$ para o campo elétrico da radiação excitante no "*hot spot*" formado pelo trímero de nanobastões esquematizado na figura. 161

Figura 64: Espectros de espalhamento (vermelho) e de absorção (preto) simulados pelo DDA para o trímero da Figura 63. Em azul apresentamos um ajuste de uma ressonância do tipo Fano. 162

Figura 65: a) Simulação DDA (azul) do espectro de espalhamento para o trímero da Figura 63 e perfil da amplitude $C_1(\omega)$ utilizando o modelo de oscilares acoplados (Eq. 72). b) perfis em relação à frequência reduzida da amplitude $C_1(\omega)$ utilizando o modelo de oscilares acoplados (preto) e da diferença de fase do oscilador com relação à radiação excitante (azul); a linha pontilhada se refere à posição onde é observada a assimetria de Fano no espectro DDA. c) perfis da amplitude $C_2(\omega)$ utilizando o modelo de oscilares acoplados (preto) e da diferença de fase do oscilador com relação à radiação excitante (azul, Eq. 73). d) perfis da diferença de fase para o oscilador 1 (preto) e oscilador 2 (vermelho). 165

Figura 66: Espectros de absorção (DDA) para os dímeros de nanobastões esquematizados na figura. 166

Figura 67: Diagrama esquemático para interação entre excitons no trímero de nanobastões esquematizado na Eq. 71. 167

Figura 68: a) Mapa do fator de intensificação SERS ($EF_{EM} = |g(920\ nm)|^4$) para o agregado de 3 nanobastões. b) Vetores de campo elétrico no interior dos nanabastões. Os detalhes na figura correspondem a ampliações nas regiões demarcadas com os quadrados vermelho, azul e verde. 168

Figura 69: a) Mapa do fator de intensificação SERS ($EF_{EM} = |g(850\ nm)|^4$) para o agregado de 3 nanobastões. b) Vetores de campo elétrico no interior dos nanabastões. Os detalhes na figura correspondem a ampliações nas regiões demarcadas com os quadrados vermelho, azul e verde. 169

Figura 70: a) Mapa do fator de intensificação SERS ($EFEM = |g(700\ nm)|^4$) para o agregado de 3 nanobastões. b) Vetores de campo elétrico no interior dos nanabastões. Os detalhes na

figura correspondem a ampliações nas regiões demarcadas com os quadrados vermelho e azul. 170

Figura 71: Configuração inicial gerada das moléculas em torno do dímero de Ag. 179

Figura 72: Algoritmo utilizado para a simulação MC do processo de difusão e adsorção molecular para análise das flutuações de intensidade. 180

Figura 73: a) Trajetória de três moléculas selecionadas na Figura 71 para visualização do processo de difusão descrito pelo algoritmo. b) perfil da soma dos fatores de intensificação experimentados por cada uma das 100 moléculas. As intensidades SERS são proporcionais ao fator de intensificação e, portanto, a figura descreve o perfil de intensidades em função do número de etapas de simulação. Cada etapa da simulação corresponde a um tempo real, que podemos inserir no programa para esta simulação através do coeficiente de difusão da molécula que se deseja simular as flutuações de intensidade SERS. 181

Figura 74: a) Valores da média sobre todas as moléculas do coeficiente de difusão em unidades KMC para diferentes probabilidades de difusão, p_{dif}. As linhas tracejadas representam o valor médio sobre o número de etapas de simulação (*Tempo KMC*). b) Relação entre o coeficiente de difusão médio e p_{dif}. 183

Figura 75: a) Dependência do número de moléculas adsorvidas com o número de etapas de simulação. b) dependência (linear) dos valores de Pa com a constante de equilíbrio calculada a partir dos dados em (a). 184

Figura 76: Funções de autocorrelação em função do tempo de simulação (Tempo KMC) para diferentes probabilidades de adsorção. 185

Figura 77: Representação da posição em torno do "*hot spot*" em função do ângulo θ 188

Figura 78: Funções de autocorrelação para diferentes valores de constante de adsorção, K (esquerda). À direita são apresentados os perfis de intensidade SERS com o tempo para cada valor K, que geraram as funções de autocorrelação. 189

Figura 79: Em a) e b) são apresentados os perfis de intensidade SERS para constante de adsorção K = 10. Em a) são apresentados os valores de intensidade integrados em 1 s e em b) o perfil é apresentado na escala de tempo da simulação KMC. Em c) e d) são apresentados resultados semelhantes a a) e b), porém com constante de adsorção K = 0,01. 190

Figura 80: Perfis de intensidades SERS experimentais em função do tempo para R6G (10 nM) obtidos para o coloide de Ag sintetizado pelo método de Lee e Meisel. Os resultados são apresentados para diferentes tempos de integração, como indicado na figura. 191

Figura 81: Perfil de intensidade SERS para o resultado da simulação KMC com K = 100 com tempo de integração de 1 s. 192

Figura 82: Variação do fator de intensificação eletromagnética em função do ângulo **θ** em relação ao centro do "*hot spot*". 193

Figura 83: Histograma dos valores de **θ** de acordo com a probabilidade descrita pela Eq. 86. 194

Figura 84: Perfil da densidade de probabilidade do fator de intensificação SERS no "*hot spot*" 195

Figura 85: Em cada linha resultados de simulações Monte Carlo para diferentes números de moléculas adsorvidas. De cima para baixo: 200, 400, 600 e 1500 moléculas. Na primeira coluna são apresentados para cada concentração os histogramas de intensidades normalizadas. Na segunda coluna encontram-se os histogramas da porcentagem de sinal correspondente a um dos dois tipos de moléculas inseridas na simulação, por exemplo, *mol1*. 197

Figura 86: Histogramas de distribuição de intensidade para os perfis de intensidade da Figura 79. 200

Figura 87: Histogramas de intensidade normalizada para diferente número de "*hot spots*" (como indicado), mantendo-se a densidade de 100 moléculas/ número de "*hot spots*" 202

Figura 88: Comparação entre os histogramas de intensidade normalizada para um sistema contendo 1 "*hot spot*" (a) e outro contendo 50 (c), em que os regimes de flutuações foram controlados e ajustados para condições semelhantes através dos formatos dos histogramas de fração de sinal (b, d). 204

Figura 89: Dependência do número de moléculas por "*hot spot*" em função do número de "*hot spot*" para manter o formato do histograma de fração de sinal, p_{mol1}, semelhante aos da Figura 88 (c, d) 204

Figura 90: Em cada linha resultados de simulações Monte Carlo para diferentes "*hot spots*". De cima para baixo "*hot spots*" formados por dímeros de nanoesferas de Au de 40 nm de diâmetro separadas por distâncias ("*gap*"): g =1, 2 e 3 nm. Em cada simulação foram utilizadas 100 moléculas adsorvidas em posições aleatórias da superfície das nanoesferas. O valor máximo do fator de intensificação no "*hot spot*" com distância 3 nm foi multiplicado por 10, simulando um aumento na potência da radiação laser por 10 vezes. 206

Figura 91: Mapas dos fatores de intensificação SERS para os "*hot spots*" com separações g = 1 nm (a), 2 nm (b) e 3 nm (c). 207

SUMÁRIO

Capítulo 1 22
Introdução 22
1 – O espalhamento Raman 25
2 – O espalhamento Raman Intensificado pela superfície (SERS) 35
3 – Espectros SE(R)RS no regime de uma molécula 45
Objetivos e organização da tese 47
Capítulo 2 49
Espectros SERS em regime de uma molécula em eletrodo ativado eletroquimicamente 49
2.1 - Motivação 49
2.2 – Experimental e computacional 53
2.3 – Resultados e discussão 58
2.5 – Conclusões parciais 76
Capítulo 3 78
Flutuações das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes 78
3.1 – Motivação 78
3.2 - Experimental 84
3.3 – Resultados e discussão 88
3.4 – Conclusões parciais 131
Capítulo 4 132
Aplicação de simulações eletromagnéticas para "*hot spots*": Uma ferramenta para o estudo das propriedades SERS no regime de uma molécula 132
4.1 – Motivação 132
4.2 – Experimental e computacional 137
4.3 – Resultados e discussão 138
4.4 – Conclusões parciais 171
Capítulo 5 173
Considerações sobre as flutuações de intensidade SERS no regime de uma molécula 173
5. 1- Motivação 173
5.2 - Experimental e computacional 176
5.3 - Resultados e discussão 177
5.4 - Conclusões Parciais 208
Capítulo 6 209
Conclusões e perspectivas 209
Referências bibliográficas 212

Capítulo 1

Introdução

A composição e as propriedades da matéria podem ser investigadas experimentalmente através de perturbação no sistema em estudo. Uma maneira de se investigar tais propriedades é através do uso de radiação eletromagnética, a qual ao interagir com a matéria pode levar a uma série de efeitos observáveis, dos quais a interpretação pode levar a conclusões importantes à cerca do sistema. Por exemplo, a absorção de radiação eletromagnética em determinados valores de energia revela o caráter discreto dos níveis energéticos da matéria. Dentre as técnicas espectroscópicas para investigação de absorção de radiação eletromagnética por sistemas moleculares, podemos citar a Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível (UV-Vis), que prova níveis eletrônicos moleculares; a Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IR), que prova os níveis vibracionais das moléculas; a Espectroscopia Rotacional (microondas), que prova os níveis rotacionais; a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que prova os spins nucleares dos átomos, etc.

Diversas informações podem ser retiradas de cada uma destas técnicas acima. Chamamos a atenção, por exemplo, da espectroscopia IR, que permite mapear as vibrações moleculares, as quais são formadas por movimentos coordenados de átomos na molécula. A análise dos espectros IR (resultado da absorção de radiação no infravermelho em diferentes energias) permite inferir sobre a estrutura e geometria molecular.

Além do efeito de absorção, outros fenômenos podem ser observados como resultado da interação entre radiação eletromagnética e a matéria, que permitem, em diferentes esferas, traçar específicas conclusões sobre o sistema. Pode-se citar, por exemplo, o espalhamento de radiação eletromagnética. Espalhamento é provocado por heterogeneidades ou flutuações

observadas em diferentes escalas.[1] Por exemplo, se considerarmos a matéria em sua constituição microscópica, a mesma é formada por moléculas, átomos, elétrons, prótons, etc, ou seja, elementos (ou partículas) discretas, as quais constituem obstáculos para a propagação da radiação eletromagnética e, portanto, heterogeneidades. Este espalhamento pode ser elástico, onde a energia da radiação espalhada é a mesma da radiação eletromagnética utilizada para perturbar o sistema, ou inelástico, em que há uma diferença entre as energias destas radiações. O espalhamento Rayleigh é um espalhamento elástico, enquanto o espalhamento Raman é um espalhamento inelástico, que corresponde ao ponto mais fundamental desta tese, o qual será discutido abaixo.

Assim como a absorção, o fenômeno de espalhamento deve ser tratado do ponto de vista mais formal através da mecânica quântica. Porém, é possível através de modelos mais simples (mecânica clássica) obter importantes conclusões sobre o fenômeno de espalhamento. Como do ponto vista geral desta tese estamos interessados essencialmente no fenômeno de espalhamento, a seguir apresentamos uma descrição clássica deste fenômeno.

O campo elétrico da luz que incide sobre uma molécula interage com os elétrons da mesma, provocando alterações na sua distribuição eletrônica, devido à polarização da densidade eletrônica. Esta polarização pode ser visualizada através de um momento de dipolo induzido ($\vec{P}$), que pode ser descrito em função do campo elétrico $\vec{E}$ da radiação incidente:

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

Eq. 1

onde $\hat{\alpha}$ corresponde ao tensor de polarizabilidade molecular e está associado à facilidade de distorção da nuvem eletrônica devido ao campo elétrico da radiação incidente. Este tensor é de ordem 2 pois transforma o vetor campo elétrico $\vec{E}$ no vetor momento de dipolo induzido $\vec{P}$. Uma representação do tensor de polarizabilidade é apresentada na Eq. 2.

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix}$$

Eq. 2

Na Eq. 2 os elementos $\alpha_{\rho\sigma}$ (ρ,σ = *x, y ou z*) da primeira linha do tensor, por exemplo, transformam as componentes do vetor campo elétrico na componente x do momento de dipolo induzido, $P_x = \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z$.

O vetor campo elétrico da radiação eletromagnética oscila no tempo e no espaço ($\vec{E}(t,r)$) e, portanto, o momento de dipolo induzido na molécula também apresenta um comportamento oscilatório. Como as dimensões moleculares são tipicamente inferiores ao comprimento de onda da luz, este comportamento oscilatório do momento de dipolo induzido pode ser descrito apenas em função do tempo:

$$\vec{P}(t) = \mathrm{Re}\left[\vec{P}\exp(-i\omega t)\right]$$

Eq. 3

A Eq. 3 corresponde a uma descrição harmônica para o momento de dipolo induzido, onde $\vec{P}$ é o vetor amplitude do momento de dipolo induzido e pode ser descrito por:

$$\vec{P} = eq\frac{\vec{r}\cdot\vec{r}}{|\vec{r}|}$$

Eq. 4

em que *e* é a carga elementar do elétron e *q* descreve a quantidade de carga da nuvem eletrônica oscilando na direção $\vec{r}$.

Na Eq. 3 ω é a frequência do movimento oscilatório de $\vec{P}(t)$, a qual apresenta o mesmo valor que a frequência da radiação excitante, ou seja:

$$\vec{E}(t) = \mathrm{Re}\left[\vec{E}_0\exp(-i\omega t)\right]$$

Eq. 5

Dipolos oscilantes são fontes de emissão de radiação eletromagnética [2-3] e a intensidade da radiação emitida por este dipolo (I_{rad}) é dependente da amplitude do mesmo e pode ser escrita, considerando a Eq. 2, Eq. 3 e Eq. 5 como:

$$I_{rad} \propto \omega^4 \mid \vec{P} \mid^2 = \omega^4 \mid \vec{E}_0 \mid^2 \sum_{\rho,\sigma} (\hat{\alpha})^2_{\rho\sigma}$$

Eq. 6

onde $(\hat{\alpha})_{\rho\sigma}$ corresponde aos elementos do tensor de polarizabilidade da Eq. 2. Na Eq. 6 consideramos o caso de uma onda plana polarizada em uma determinada direção com amplitude E_0.

Observa-se na Eq. 6 que a intensidade da radiação emitida (no sentido da mecânica clássica) pelo dipolo (radiação espalhada) é proporcional à quarta potência da frequência de oscilação (frequência da radiação espalhada) e ao quadrado do campo elétrico da radiação incidente. Além disso, observa-se uma dependência quadrática com os elementos do tensor de polarizabilidade.

1 – O espalhamento Raman

O espalhamento descrito acima é elástico uma vez que as frequências da radiação espalhada e incidentes são iguais. Porém há a possibilidade de espalhamento inelástico como é o caso do espalhamento Raman, em que as radiações espalhadas apresentam frequências diferentes da frequência da radiação incidente. A origem para este espalhamento inelástico é a presença, assim como no caso do espalhamento elástico, de heterogeneidades ou flutuações.

Há uma possibilidade de que existam flutuações na polarizabilidade molecular, sendo que a existência destas flutuações de polarizabilidade é que dá origem ao espalhamento inelástico.[4]

As diferenças entre a frequência da radiação incidente e as radiações espalhadas estão associadas à origem das flutuações de polarizabilidade. Estas flutuações podem ser originadas, por exemplo, através de vibrações moleculares. Neste caso, as diferenças de

energia acima estão associadas às frequências vibracionais da molécula e o espalhamento inelástico é chamado espalhamento Raman vibracional. Deste ponto em diante na tese, utilizaremos somente espalhamento Raman por simplicidade, mas sempre se referindo a espalhamento Raman vibracional.

A frequência da radiação espalhada pode ser tanto maior (espalhamento Raman anti-Stokes), quanto menor (espalhamento Raman Stokes) que a frequência da radiação incidente, sendo que as frequências das radiações espalhadas anti-Stokes e Stokes são simétricas em torno da frequência da radiação incidente (tipicamente de um laser), ou seja, apresentam a mesma informação em termos de frequência vibracional. As características dos espalhamentos anti-Stokes e Stokes serão discutidas mais detalhadamente ao longo desta tese (Capítulo 3). A seguir, apresentamos diferentes abordagens para o tratamento do espalhamento Raman: os modelos clássico e quântico.

1.1 - Descrição Clássica

Nosso ponto de partida nesta descrição do espalhamento Raman do ponto de vista clássico é o modelo de espalhamento segundo a formação de um dipolo induzido P na molécula devido a interação com o campo elétrico E da radiação incidente, descrito acima. Neste caso, o modelo descreve as alterações na polarizabilidade devido ao movimento vibracional, descrito pelas coordenadas normais de vibração, Q.

A dependência da polarizabilidade com a coordenada vibracional Q_j do modo de vibração j[*] pode ser escrita como uma expansão em série de Taylor:

$$\hat{\alpha}(Q_j) = \hat{\alpha} + \left(\frac{\partial \hat{\alpha}}{\partial Q_j}\right)_0 Q_j(t) + \left(\frac{\partial^2 \hat{\alpha}}{\partial Q_j^2}\right)_0 Q_j^2(t) + \ldots$$

Eq. 7

[*] j corresponde a um dos 3N-6 graus de liberdade vibracionais, onde N é número de átomos que constituem a molécula.

onde a derivada da polarizabilidade é considerada na posição de equilíbrio da vibração molecular (sobescrito 0 nas derivadas parciais). O primeiro termo corresponde à polarizabilidade molecular e o termo

$$\hat{R}_j = \left(\frac{\partial \hat{\alpha}}{\partial Q_j} \right)_0$$

Eq. 8

está relacionado ao chamado tensor de polarizabilidade Raman. A Eq. 7 descreve a regra de seleção para o espalhamento Raman: deve haver variação da polarizabilidade com a coordenada vibracional, ou seja, o tensor de polarizabilidade Raman deve apresentar elementos diferentes de zero.

Desta forma, podemos reescrever a expressão para o momento de dipolo induzido incorporando-se a dependência na Eq. 7. Considerando-se uma aproximação harmônica para a coordenada vibracional, ou seja:

$$Q_j(t) = \mathrm{Re}\left[Q_j^0 \exp(-i\omega_j t)\right] = \frac{1}{2} Q_j^0 \left[\exp(-i\omega_j t) + \exp(i\omega_j t)\right]$$

Eq. 9

onde Q_j^0 corresponde à amplitude da coordenada normal e ω_j é a frequência vibracional do modo *j*, podemos escrever para a expressão do momento de dipolo induzido:

$$\vec{P}(t) = \hat{\alpha}(Q_j)\vec{E}(t)$$

e portanto, utilizando-se a Eq. 5, Eq. 7 e Eq. 9, temos que

$$\vec{P}(t) = \hat{\alpha}\,\mathrm{Re}\left[\vec{E}_0 \exp(-i\omega t)\right] + \frac{1}{2}\hat{R}_j Q_j^0 \left[\exp(-i\omega_j t) + \exp(i\omega_j t)\right]\mathrm{Re}\left[\vec{E}_0 \exp(-i\omega t)\right]$$

ou

$$\vec{P}(t) = \hat{\alpha}\vec{E}_0\,\mathrm{Re}\left[\exp(-i\omega t)\right] + \frac{1}{2}\hat{R}_j Q_j^0 \vec{E}_0 \left\{\mathrm{Re}\left[\exp\left(-i(\omega+\omega_j)t\right)\right] + \mathrm{Re}\left[\exp\left(-i(\omega-\omega_j)t\right)\right]\right\}$$

Eq. 10

O primeiro termo da Eq. 10 descreve o espalhamento Rayleigh (elástico), enquanto o segundo e terceiro termos descrevem o espalhamento anti-Stokes (radiação espalhada com

frequência $\omega+\omega_j$) e Stokes (radiação espalhada com frequência $\omega-\omega_j$). ω e ω_j apresentam os mesmos significados apresentados acima. Como se pode notar, os dois espalhamentos apresentam-se deslocados da frequência da radiação incidente pela frequência vibracional, como discutido acima. A expressão para a intensidade do espalhamento Rayleigh é semelhante à Eq. 6, enquanto que as expressões para as intensidades Raman (I_{Raman}), no Stokes e anti-Stokes, podem ser escritas por:

$$I_{Raman} \propto (\omega \pm \omega_j)^4 \mid \vec{E}_0 \mid^2 \sum_{\rho,\sigma} (\hat{\alpha}_R)^2_{\rho\sigma}$$

Eq. 11

onde $\hat{\alpha}_R$ é o tensor de polarizabilidade Raman ($\hat{\alpha}_R = (1/2)\hat{R}_j Q_j^0$) e $(\hat{\alpha}_R)_{\rho\sigma}$ são os elementos deste tensor. A expressão acima descreve a dependência do espalhamento Raman com o tensor de polarizabilidade Raman, com a intensidade da radiação incidente (relacionada a $\mid \vec{E}_0 \mid^2$) e com a frequência da radiação espalhada ($\omega \pm \omega_j$) onde o símbolo + se aplica para o espalhamento anti-Stokes e o – para o Stokes.

O cálculo das intensidades Raman depende, segundo a Eq. 11, do conhecimento do tensor de polarizabilidade, cuja modelagem adequada é realizada através de modelos quânticos, o que constitui o tema da sessão 1.2. Porém, podemos ainda utilizar o modelo clássico para a polarizabilidade $\hat{\alpha}$ da molécula para antecipar algumas propriedades do espalhamento Raman.

O modelo mais simples do ponto de vista clássico para a polarizabilidade molecular é a obtida considerando-se o problema de separação de cargas em um movimento harmônico (possivelmente com amortecimento) provocado por um campo elétrico oscilante, o qual gera um par elétron-buraco que apresenta uma força de restauração. A resolução deste problema, conhecida como modelo de Lorentz para a polarizabilidade molecular [2, 5], apresenta uma dependência do tipo:

$$\hat{\alpha}(\omega) = \frac{e^2}{m} \frac{1}{\left(\omega_0^2 - \omega^2 - i\Gamma\omega\right)}$$

Eq. 12

onde m, Γ e ω_0 são a massa do elétron, a constante de amortecimento do movimento oscilatório e ω_0 corresponde à frequência natural do oscilador. A Eq. 12 descreve uma forte dependência com a frequência da radiação incidente, ω, sendo que quando este valor se aproxima da frequência natural do oscilador, $\hat{\alpha}$ atinge um valor máximo. Este modelo simples descreve uma condição de ressonância para $\hat{\alpha}$, e, portanto, para a intensidade da radiação espalhada, a qual pode ser, por exemplo, uma ressonância com uma transição eletrônica da molécula. Esta contribuição ressonante é de extrema importância para a espectroscopia Raman em geral e, sobretudo, para alguns resultados apresentados nesta tese (Capítulo 3).

1.2 - Descrição quântica e o espalhamento Raman ressonante

O modelo clássico acima, apesar de mostrar a origem do espalhamento Raman e predizer a correta dependência da intensidade com as frequências vibracionais, sofre de algumas limitações. Por exemplo, a existência do espalhamento Raman requer a existência de elementos não nulos no tensor de polarizabilidade Raman e, mais do que isso, requer a existência de vibrações moleculares. Do ponto de vista clássico, uma molécula no estado fundamental (não perturbada) não deveria apresentar vibrações, o que indicaria a inexistência, de acordo com este formalismo, do espalhamento Raman destas moléculas. Isto não está de acordo com a realidade e, de fato, a maior contribuição para as intensidades Raman no lado Stokes é devido a moléculas no estado vibracional fundamental do estado eletrônico fundamental. Do ponto de vista da mecânica quântica isto pode ser mais facilmente entendido, através da existência de uma "energia do ponto zero", em que a molécula, mesmo no estado fundamental, encontra-se em movimento vibracional [5], o que justifica a existência do espalhamento Raman de moléculas no estado vibracional fundamental.

Desta forma, a modelagem mais adequada para $\hat{\alpha}_R$ deve ser obtida utilizando-se resultados da mecânica quântica. Neste caso, o espalhamento pode ser entendido de forma semelhante ao caso do modelo clássico e, inclusive, a radiação eletromagnética pode ser tratada do ponto de vista da mecânica clássica e somente a molécula é considerada do ponto de vista da mecânica quântica, em que os estados moleculares são descritos por funções de onda Ψ que são autoestados obtidos da resolução da equação de Schrödinger para a molécula. Pelo fato de que neste tratamento a radiação eletromagnética é considerada em termos da mecânica clássica, o mesmo muitas vezes é chamado "semi-clássico" em diversas situações.[4]

A radiação eletromagnética provoca uma perturbação nas funções de onda Ψ que descrevem os estados moleculares. Esta perturbação pode ser descrita através da inclusão na equação de Schrödinger de um operador hamiltoniano de perturbação, que neste caso em especial corresponde ao potencial elétrico provocado pelo campo elétrico da radiação eletromagnética ($\hat{p}.\vec{E}$, onde $\hat{p}$ é o operador momento de dipolo). Temos então dois conjuntos de funções de onda que descrevem o sistema antes e após a perturbação, os quais são descritos por $\Psi^{(0)}$ e $\Psi^{(1)}$, respectivamente. Os sobrescritos (0) e (1) correspondem às funções de onda não perturbadas e perturbadas, respectivamente. O símbolo (1) se refere ao fato de que as funções de onda perturbadas são obtidas através de correções de primeira ordem segundo a teoria de perturbação. De acordo com esta descrição, podem ser calculadas diversas propriedades referentes ao efeito da perturbação, como por exemplo, probabilidades de transições entre estados moleculares induzidas pela radiação excitante, que estão relacionadas ao momento de transição de dipolo.[4]

De forma semelhante ao exposto na descrição clássica, o efeito da radiação eletromagnética pode ser entendido como sendo o de causar uma polarização da densidade eletrônica molecular, levando à formação de um momento de dipolo induzido. Neste caso a

radiação eletromagnética induz uma alteração no estado da molécula, inicialmente em um estado $\Psi_i^{(0)}$, a um estado final $\Psi_f^{(0)}$ após o espalhamento. Esta alteração pode ser descrita em termos do momento de dipolo de transição $(p)_{fi}$, o qual faz o papel do momento de dipolo induzido do tratamento clássico. A expressão para $(p)_{fi}$ segundo a teoria de perturbação de primeira ordem, ou seja, $(p^{(1)})_{fi}$ é [4]:

$$\left(p^{(1)}\right)_{fi} \propto \frac{1}{2\hbar}\sum_{r\neq i,f}\left\{\frac{\left\langle\Psi_f\left|\hat{p}_\rho\right|\Psi_r\right\rangle\left\langle\Psi_r\left|\hat{p}_\rho\right|\Psi_i\right\rangle}{\omega_{ri}-\omega-i\Gamma}+\frac{\left\langle\Psi_f\left|\hat{p}_\rho\right|\Psi_r\right\rangle\left\langle\Psi_r\left|\hat{p}_\rho\right|\Psi_i\right\rangle}{\omega_{ri}+\omega-i\Gamma}\right\}E_{\sigma 0}\exp\left(-i(\omega\pm\omega_{fi})t\right)$$

Eq. 13

onde, $\left\langle\Psi_a\left|\hat{p}_\rho\right|\Psi_b\right\rangle$ corresponde à componente ρ do momento de dipolo de transição entre os estados *a* e *b* da molécula. $E_{\sigma 0}$ é a componente σ (x,y ou z) da amplitude do campo elétrico da radiação excitante. ω_{fi} é a diferença de energia entre os estados *i* e *f* da molécula e, no caso destes estados corresponderem a estados vibracionais, esta diferença de energia corresponde à frequência vibracional e o momento de dipolo de transição acima pode ser interpretado como uma fonte para o espalhamento de radiação com frequência $\omega_s = \omega\pm\omega_{fi}$, ou seja, descreve o espalhamento Raman anti-Stokes (+) e Stokes (-). Portanto, por analogia aos componentes para os espalhamentos anti-Stokes e Stokes da Eq. 10, o tensor de polarizabilidade Raman pode ser escrito como:

$$(\hat{\alpha}_R)_{\sigma\rho} = \frac{1}{\hbar}\sum_{r\neq i,f}\left\{\frac{\left\langle\Psi_f\left|\hat{p}_\rho\right|\Psi_r\right\rangle\left\langle\Psi_r\left|\hat{p}_\rho\right|\Psi_i\right\rangle}{\omega_{ri}-\omega-i\Gamma}+\frac{\left\langle\Psi_f\left|\hat{p}_\rho\right|\Psi_r\right\rangle\left\langle\Psi_r\left|\hat{p}_\rho\right|\Psi_i\right\rangle}{\omega_{ri}+\omega-i\Gamma}\right\}$$

Eq. 14

A Eq. 14 é conhecida como equação de dispersão de Kramers-Heisenberg-Dirac a partir da qual as intensidades Raman podem ser calculadas através de:

$$I(\omega_s;\omega) \propto \omega_s^4 E_0^2 \sum_{\rho,\sigma}(\hat{\alpha}_R)_{\sigma\rho}^2$$

Eq. 15

Na Eq. 14 a soma é sobre todos os autoestados *r* da molécula e, portanto, o cálculo da intensidade necessita, em princípio, do conhecimento de todos estes estados e suas respectivas energias, o que não é possível de ser feito. Porém, analisando-se o denominador da Eq. 14, podemos considerar duas situações que podem ser obtidas experimentalmente. A primeira (I) corresponde ao caso da aproximação de que *r* apresenta energia maior que *i* e *f*, e que a frequência da radiação excitante ω é bem menor do que a frequência associada a uma transição $|i\rangle \rightarrow |r\rangle$[†], ou seja, $\omega << \omega_{ri}$, onde esta transição pode ser, por exemplo, entre os estados eletrônicos fundamental e primeiro excitado. Esta seria, por exemplo, a situação Raman normal. Uma outra situação (II) seria, por exemplo, o caso em que $\omega \approx \omega_{ri}$, que constitui, dentro das aproximações acima, uma condição em que a radiação excitante está em ressonância com uma transição eletrônica (permitida) da molécula, o que corresponde ao chamado efeito Raman ressonante. Embora uma grande parte dos experimentos Raman seja realizada na condição de Raman normal, o efeito Raman ressonante é sem dúvida de extrema importância para o entendimento do efeito SERS (espalhamento Raman intensificado pela superfície), que constitui o tema desta tese e, portanto, daremos enfoque à situação II apenas.

A Eq. 14 pode ser lida como uma combinação linear de produtos de momentos de dipolo de transição do tipo $\langle f|\hat{p}_\rho|r\rangle\langle r|\hat{p}_\rho|i\rangle$ onde o peso de cada produto está no denominador. Se considerarmos $|r\rangle$ o primeiro estado eletrônico excitado e $|i\rangle$ e $|f\rangle$ estados vibracionais do estado eletrônico fundamental, respectivamente, este primeiro estado eletrônico excitado domina na soma, o que permite reescrever a expressão da Eq. 14 levando-se em consideração somente o primeiro e segundo estados eletrônicos, o que simplifica o problema. Além disso, percebemos que em relação ao Raman normal, nesta condição de ressonância há uma maior intensidade Raman se a transição eletrônica é permitida (os

[†] Neste caso utiliza-se $|i\rangle$ para designar $|\Psi_i\rangle$.

momentos de dipolo de transição na somatória não são nulos). Apesar desta simplificação, a nova expressão para $(\hat{\alpha}_R)_{\sigma\rho}$ ainda contém uma soma sobre todos os estados vibracionais dos estados eletrônicos fundamental e excitado. A análise desta situação do ponto de vista quantitativo não é tão simples e constitui o tema de capítulos inteiros de livros-texto. Como este não corresponde o intuito desta introdução, discutimos apenas os aspectos qualitativos da Eq. 14.

Este espalhamento Raman ressonante é bastante importante, pois corresponde a um mecanismo de intensificação do espalhamento Raman, o qual se comparado, por exemplo, à emissão de fluorescência ou a absorção no infravermelho, é um efeito de baixa probabilidade de ocorrência. Esta probabilidade pode ser descrita pela chamada secção de choque (σ), que descreve quão eficiente é o processo para sua observação experimental. Na Tabela 1 são apresentadas secções de choque para alguns dos processos mencionados até momento de interação entre radiação eletromagnética e matéria, onde é dada ênfase para o caso dos espalhamentos Raman e Raman ressonante.

Tabela 1: Comparação entre secções de choque (σ) para diferentes processos de interação entre radiação eletromagnética e matéria. Esta tabela é adaptada da referência [6].

Processo	**Secção de choque (σ) / cm^2**
Absorção no UV-Vis	10^{-18}
Absorção no IR	10^{-21}
Emissão de fluorescência	10^{-19}
Espalhamento Rayleigh	10^{-26}
Espalhamento Raman	**10^{-29}**
Espalhamento Raman ressonante	**10^{-24}**

Na Tabela 1 observa-se, por exemplo, que o espalhamento Raman (normal) apresenta secção de choque que é ordens de grandeza menor que a de outras técnicas bastante empregadas em espectroscopia molecular para a investigação de diversos problemas, como a absorção no IR ou no UV-Vis, o que torna a espectroscopia Raman (normal) uma ferramenta

com baixo poder para determinadas aplicações, como a analítica, devido ao baixo sinal observado em determinadas condições experimentais. Na condição ressonante, porém, observa-se um aumento considerável na secção de choque (tipicamente de 5 ordens de grandeza), o que sem dúvidas é de grande interesse em determinados sistemas.

A intensificação Raman ressonante, porém, não ocorre da mesma maneira para o espectro como um todo, mas observa-se que as bandas no espectro Raman, relacionadas ao cromóforo responsável pela transição eletrônica, são mais intensificadas que as demais, o que possibilita, por exemplo, a utilização da técnica Raman ressonante para identificação destes cromóforos a partir da análise do espectro vibracional.

A espectroscopia Raman de acordo com o apresentado acima é uma técnica vibrônica (vibracional + eletrônica), pois permite o acesso à informações vibracionais e eletrônicas da espécie molecular em estudo, o que conduz a técnica a um elevado patamar de importância para uma ampla gama de aplicações, tanto para o caso da investigação de propriedades moleculares, quanto como uma técnica auxiliar para investigação de diferentes processos. Neste ponto, queremos ressaltar, por exemplo, a aplicação da espectroscopia Raman para o estudo de processos eletroquímicos. Isto se baseia no estudo dos espectros Raman de espécies moleculares adsorvidas em um eletrodo metálico para diferentes potenciais aplicados. Os processos de oxidação e/ou redução das moléculas podem, portanto, ser acompanhados por mudanças nos espectros Raman referentes a determinados modos vibracionais.

Em um estudo como este, Fleishmann e col. [7] reportaram em 1974 um estudo sobre o espalhamento Raman de piridina adsorvida em eletrodo de Ag. O enfoque destes autores estava no estudo Raman espectroeletroquímico (espectroscopia Raman + eletroquímica) das moléculas adsorvidas. Devido ao baixo sinal Raman que pode ser obtido de uma monocamada de moléculas adsorvidas, os autores ajustaram as condições experimentais para que um maior número de moléculas pudessem ser excitadas pela radiação laser excitante, porém ainda na

condição de monocamada, o que foi feito através do aumento da área superficial do eletrodo. Este aumento da área foi realizado através de um procedimento eletroquímico de oxidação e redução do eletrodo, o que gera uma rugosidade e, portanto, aumento da área superficial. Com este procedimento os autores verificaram um enorme aumento das intensidades das bandas nos espectros Raman coletados. Este aumento, foi em primeira instância, interpretado como sendo resultado direto do aumento da área do eletrodo e consequente aumento do número de moléculas iluminadas pela radiação excitante. Porém, a intensificação observada estava muito acima da esperada considerando-se o aumento da área superficial. Além disso, a contínua aplicação de ciclos de oxidação e redução levava em alguns casos a uma diminuição do sinal observado, o que não pode ser explicado de acordo com esta interpretação. Neste ponto Jeanmaire e Van Duyne [8] e Albretch e Creighton [9], independentemente, demonstraram que o aumento da área superficial não poderia explicar a intensificação observada e, uma vez que não se esperava nenhum outro mecanismo de intensificação Raman além do efeito Raman ressonante, os resultados foram interpretados à luz de um novo mecanismo de intensificação, o qual foi chamado de Espalhamento Raman Intensificado pela Superfície (SERS). A seguir apresentamos uma discussão sobre o efeito SERS.

2 – O espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS)

Para guiar a discussão do efeito SERS consideramos dois tipos de observações experimentais. Uma delas (I) é que a magnitude da intensificação SERS é dependente do tipo de metal utilizado como superfície metálica. Os resultados indicam que Ag, Au e Cu são os melhores candidatos para observação de intensificações para radiações laser no visível. Além disso, há uma dependência com fatores geométricos associados à superfície metálica, como pode ser observado através da dependência da intensificação com a rugosidade, como abordado acima, ou ainda o fato de que suspensões de nanopartículas coloidais de determinadas geometrias e tamanhos podem levar à altíssimas intensificações SERS. Esta

contribuição para a intensificação SERS está relacionada à superfície metálica e a discutiremos em detalhes na sessão 2.2, abaixo.

O outro aspecto (II) que não podemos esquecer é que o sinal SERS observado é obtido de moléculas adsorvidas nesta superfície e, portanto, deve depender da interação entre a molécula e a superfície, como por exemplo o tipo de adsorção (química ou física). De fato este é o caso e se observa diferentes intensificações SERS para diferentes moléculas adsorvidas em um mesmo tipo de superfície metálica. Além disso, resultados na literatura mostram, para o caso do eletrodo rugoso, a existência de um perfil de intensificação SERS com o potencial aplicado para diferentes modos vibracionais em determinadas condições experimentais. Nestes casos, as intensidades SERS para algumas bandas, utilizando-se a mesma radiação excitante, podem atingir valores máximos em determinados potenciais aplicados e voltam a diminuir com a contínua alteração do potencial. Estes perfis são semelhantes ao perfil Raman ressonante (perfil de intensidades de uma banda em função do comprimento de onda da radiação excitante), em que o máximo corresponde à ressonância entre a radiação excitante (laser) e uma transição eletrônica na molécula. Este tipo de observação no SERS sugere uma contribuição que não é exclusiva do metal, mas que também envolve os estados eletrônicos da espécie molecular adsorvida. O mecanismo de intensificação relacionado a estes resultados é discutido na sessão 2.1.

2.1 - Mecanismo químico de intensificação (CE)

O mecanismo químico explica as observações experimentais apresentadas em (II) acima. A ideia por traz de tal mecanismo é de que, em relação à molécula livre, a adsorção molecular leva a alterações no tensor de polarizabilidade Raman $(\hat{\alpha}_R)$. Desta forma, o mecanismo CE de intensificação SERS está relacionado a alterações neste tensor de polarizabilidade, que são resultado da formação de um complexo entre a molécula e o metal. Esta formação de um complexo de superfície permite, portanto, a transferência de densidade

de carga entre a molécula e o metal, o que corresponde ao motivo para as alterações no tensor de polarizabilidade.

Este modelo de transferência de carga está representado no esquema da Figura 1, onde se considera que, com a adsorção molecular, o nível de Fermi do metal (maior densidade de estados/separação entre a banda de condução e valência no metal), designado por $|F\rangle$, situa-se entre os níveis eletrônicos fundamental (HOMO ou $|I\rangle$ na figura) e primeiro excitado (LUMO ou $|K\rangle$ na figura), como indicado a seguir:

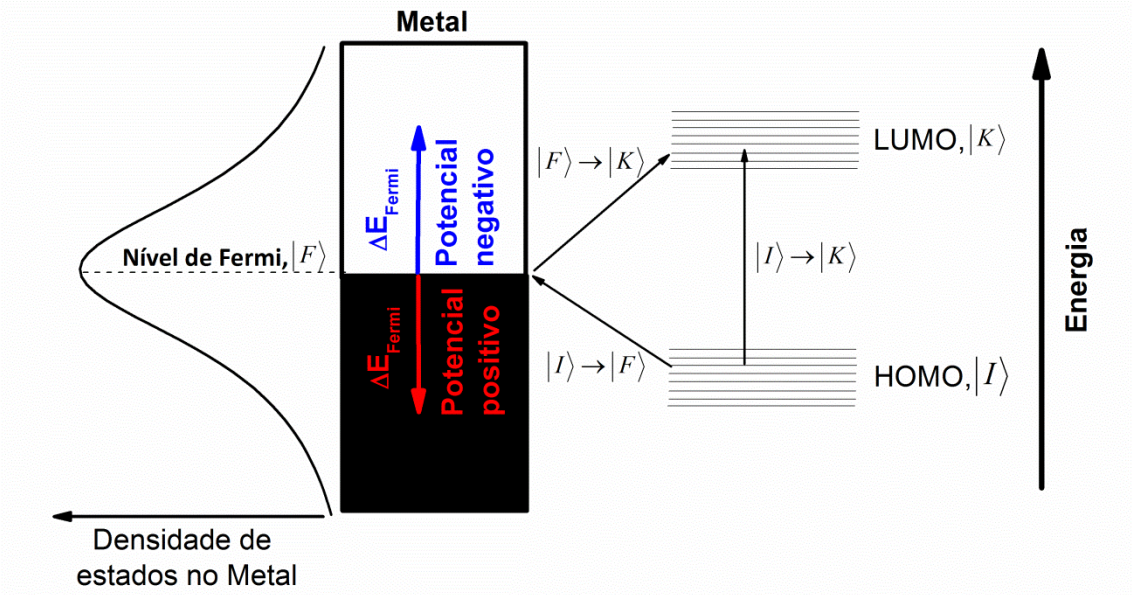


Figura 1: Modelo de transferência de carga entre estados do metal e da molécula adsorvida.

Na Figura 1 a transição HOMO-LUMO representada por $|I\rangle \rightarrow |K\rangle$ é responsável pelo efeito Raman ressonante, discutido na sessão 1.2, acima, e representado pela Eq. 14, onde se observa a condição de ressonância através do denominador da equação, ou seja, quando a radiação excitante apresenta energia igual ou próxima à energia da transição eletrônica. Na Figura 1 também são apresentadas transições eletrônicas associadas aos processos de transferência de carga entre a superfície e a molécula: $|I\rangle \rightarrow |F\rangle$ para a transferência de carga da molécula para o metal e $|F\rangle \rightarrow |K\rangle$ para a transferência de carga do

metal para a molécula. Estas transferências de carga ocorrem próximo ao nível de Fermi devido à maior densidade de estados para esta energia, o que leva a uma maior probabilidade de transição (maior momento de dipolo de transição). De forma semelhante ao caso do efeito Raman ressonante, espera-se um aumento do tensor de polarizabilidade e, consequentemente da intensidade SERS se a radiação excitante (laser) está em ressonância com estas transferências de carga. Portanto, espera-se contribuições para o tensor de polarizabilidade da molécula adsorvida $(\hat{\alpha}'_R)$, contribuições ressonantes semelhantes à Eq. 14 envolvendo o nível de Fermi. Isto pode ser obtido em um formalismo semelhante ao de Albretch [4, 10] para o efeito Raman ressonante, em que se considera através de teoria de perturbação correções nas funções de onda molecular devido ao movimento vibracional (acoplamento de Herzberg-Teller). No caso do efeito Raman ressonante, este formalismo descreve os estados perturbados através de uma combinação linear de todos os estados da molécula, sendo os coeficientes desta combinação inversamente proporcionais à diferença de energia entre o estado a ser corrigido e todos os outros estados da molécula. Isto sugere que, por exemplo, estados excitados de energias mais altas não contribuam de maneira significativa para esta correção como o primeiro estado eletrônico excitado (LUMO) contribui.

No caso do SERS, esta correção nos estados da molécula é realizada considerando-se os estados do metal e, uma vez que estes estados do metal apresentam energias situadas entre o HOMO e LUMO da molécula, o peso de estados do metal de energias mais elevadas não podem ser desconsiderados como no efeito Raman ressonante e, portanto, diferentes efeitos podem ser observados, como por exemplo, a possibilidade de uma maior intensificação de modos vibracionais não-totalmente simétricos no SERS em relação ao Raman ressonante.[10-11]

A ressonância com estes processos de transferência de carga pode ser modulada pela escolha da radiação laser excitante, a exemplo do efeito Raman ressonante. Um fato

interessante é que a aplicação de potencial (em um experimento espectroeletroquímico), altera a posição do nível de Fermi no metal [12], como indicado na Figura 1, o que, consequentemente, leva a alterações na condição de ressonância para os processos de transferência de carga considerando-se uma mesma radiação excitante. Portanto, medidas de intensidade SERS em função do potencial aplicado podem revelar valores máximos para um determinado potencial aplicado, o que está diretamente associado aos processos de transferência de carga entre a molécula e o metal.

2.2 - Mecanismo eletromagnético de intensificação (EM)

Um outro mecanismo para a intensificação Raman de moléculas adsorvidas em superfície diz respeito às propriedades do substrato metálico utilizado no experimento SERS. A experiência indica a necessidade de utilização de nanopartículas de Ag, Au ou Cu para obtenção de altas intensificações SERS. Este mecanismo, em princípio, não está associado às características da molécula investigada, como é o caso do mecanismo CE. Em termos da Eq. 15 isto significa a influência do metal na intensificação dos elementos fora da somatória, ou seja, a intensificação do campo elétrico da radiação experimentada pela molécula. Em outras palavras, a nanoestrutura metálica atua como uma "*antena*" concentrando o campo na superfície da nanoestrutura. Pelo fato de estar associado à intensificação do campo elétrico, este mecanismo é chamado eletromagnético (EM).

Este efeito de concentração do campo elétrico na superfície de nanoestruturas destes metais está relacionado às propriedades ópticas dos mesmos e é um efeito de grande interesse no campo de ciências dos materiais como um todo. A origem destas intensificações é devido a ressonâncias na oscilação dos elétrons livres do metal, as quais são conhecidas como ressonâncias de plasmon de superfície.

Plasmon de superfície é uma *excitação coletiva* da densidade de elétrons livres do metal. Assim como no caso do dipolo induzido em moléculas devido à perturbação de um

campo elétrico externo, estas excitações coletivas correspondem à resposta óptica dos metais frente à perturbação. Embora o tratamento adequado deste sistema de muitos elétrons seria do ponto de vista da mecânica quântica, o mesmo pode ser tratado do ponto de vista de resposta óptica, ou seja, através do eletromagnetismo clássico e de fato este é o caso da maior parte dos trabalhos teóricos para o estudo dos efeitos das ressonâncias de plasmon de superfície.

A resposta óptica de materiais pode ser descrita através da função dielétrica (ε), a qual descreve, do ponto de vista clássico, às propriedades da matéria frente à absorção e espalhamento de luz. Na realidade, pode-se mostrar que a função dielétrica está relacionada à polarizabilidade através da relação de Clausius-Mossotti, que será discutida no Capítulo 4 desta tese. O campo elétrico experimentado por uma molécula na superfície do metal é o resultado da soma dos campos elétricos incidente e espalhado pelo metal. De forma semelhante ao exposto anteriormente, a radiação espalhada pode ser interpretada como resultado de uma fonte de dipolo oscilante. No caso dos metais considerados, a situação é bem mais complexa, pois ao invés de um único dipolo como fonte para emissão desta radiação, temos na realidade uma distribuição de dipolos induzidos na superfície. Portanto, neste caso, chamamos $\vec{P}(\vec{r},t)$ a polarização dos elétrons nesta superfície metálica, a qual corresponde a uma soma dos elementos desta distribuição. Nota-se que, além da dependência temporal também observada no caso de um único dipolo, há uma dependência com a posição $\vec{r} = (x, y, z)$, resultado do fato de se ter uma distribuição de polarizações no metal.

$$\vec{P}(\vec{r},t) = \epsilon_0[\varepsilon(\vec{r},t) - 1]\vec{E}_0(\vec{r},t)$$

Eq. 16

onde ϵ_0 é a permissividade elétrica no vácuo. O fato de que os metais utilizados em SERS são Ag, Au e Cu, está relacionado às propriedades ópticas destes materiais, ou seja, está relacionada às funções dielétricas $\varepsilon(\vec{r},t)$ destes metais. A seguir faremos uma breve discussão sobre estas funções dielétricas.

A exemplo do que foi feito acima para caso de funções complexas, podemos escrever $\varepsilon(\vec{r},t)$ como:

$$\varepsilon(\vec{r},t) = \mathrm{Re}[\varepsilon(\vec{r},\omega)\exp(-i\omega t)]$$

Eq. 17

onde $\varepsilon(\vec{r},\omega)$ é a função dielétrica complexa, que depende da frequência da radiação excitante. Em SERS, em geral, a dependência radial da função dielétrica não é levada em consideração (aproximação não-local), o que, para a maioria dos casos constitui uma boa aproximação.[13-17] Portanto, podemos escrever:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$$

Eq. 18

onde $\varepsilon_1(\omega)$ e $\varepsilon_2(\omega)$ são as partes real e imaginária da função dielétrica.

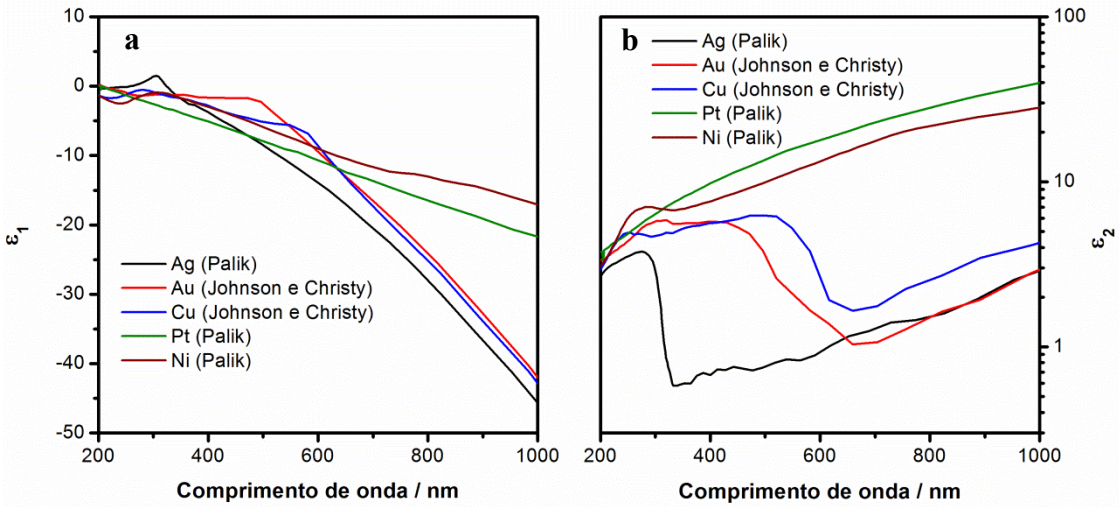


Figura 2: a) Parte real da função dielétrica $\varepsilon_1(\omega)$ em função do comprimento de onda. b) mesmo que em (a) para a parte imaginária da função dielétrica $\varepsilon_2(\omega)$.

Na **Figura 2** são apresentados valores experimentais (compilações de Palik [18] e Johnson e Christy [19]) de ε_1 e ε_2 para diferentes comprimentos de onda de excitação para Ag, Au e Cu, metais que possibilitam intensificações SERS, comparados com Pt e Ni, que não permitem a obtenção do mesmo nível de intensificação do espectro Raman. A primeira característica importante desta função dielétrica é que a sua parte real é negativa para estes metais na região do visível (região em que as medidas SERS são realizadas), o que está relacionado à alta refletividade de metais[20] (materiais transparentes apresentam função

dielétrica real e positiva). Portanto, esta parte real está relacionada ao espalhamento. Observa-se que Ag, Au e Cu apresentam valores semelhantes na região do visível para ε_1, o que indica semelhantes respostas para estes metais em relação ao espalhamento. Da mesma maneira, Pt e Ni apresentam valores semelhantes na região do visível e que não são tão diferentes dos valores para os demais metais discutidos (pelo menos na região até 600 nm), o que mostra que apenas a parte real da função dielétrica não corresponde ao motivo para a observação de espectros SERS intensos para alguns metais mas não para outros na região do visível.

A parte imaginária das funções dielétricas estão relacionadas à absorção. No caso dos metais apresentados, Pt e Ni apresentam alta contribuição de absorção (devido a transições interbandas), as quais concorrem contra a excitação de modos de plasmon de superfície. Esta absorção na região do visível é o que inviabiliza a utilização destes metais para o efeito SERS. No caso dos demais metais, a Ag apresenta valores apreciáveis apenas na região abaixo de 300 nm, não apresentando contribuições de absorção na região do visível, o que mostra o motivo pelo qual substratos de Ag são os que permitem as maiores intensificações SERS.

Au e Cu apresentam absorções na região abaixo de 500 e 600 nm, respectivamente. Na região acima de 600 nm, porém, os valores de ε_2 são semelhantes aos da Ag (especialmente Au), justificando o fato de se utilizar estes metais em SERS. A presença de contribuições de absorção (interbanda) para o Au e Cu nas regiões mencionadas faz com que as ressonâncias de plasmon de superfície para estes metais sejam deslocadas para o vermelho (maior comprimento de onda) em relação à Ag, fato que é observado experimentalmente.

Como mencionado, a superfície metálica deve ter dimensões em escala nanométrica (até cerca de 100 nm) para se observar intensificações SERS na região do visível. Isto pode ser observado através do cálculo do campo elétrico na superfície de nanopartículas de diferentes geometrias e tamanhos, o que é feito através da resolução das equações de Maxwell. Estas equações apresentam soluções exatas apenas para algumas geometrias e,

portanto, para evitar complicações, discutimos o caso de esferas de raio *a* bastante inferior ao comprimento de onda (λ) da radiação eletromagnética, situação em que permite escrever para o campo elétrico incidente $\vec{E}_0(\vec{r},t) \approx \vec{E}_0$. Com isto, o problema pode ser tratado do ponto de vista eletrostático (resolução da equação de LaPlace). Para o caso de uma excitação dipolar do plasmon de superfície, o campo elétrico fora da nanoestrutura ($\vec{E}(\vec{r})$) é dado por[21]:

$$\vec{E}(\vec{r}) = \left|\vec{E}_0\right| \frac{\vec{r}}{|\vec{r}|} + \frac{2}{|\vec{r}|^4} \left(\frac{\varepsilon_1(\omega) - \varepsilon_0 + i\varepsilon_2(\omega)}{\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_0 + i\varepsilon_2(\omega)} \right) a^3 \vec{r}$$

Eq. 19

onde ε_0 é a constante dielétrica do meio onde a nanoesfera se encontra, por exemplo, água (~1,777). Na Eq. 19 se observa uma condição de ressonância dada por $\varepsilon_1(\omega) = -2\varepsilon_0$ o que somente é possível pelo fato de que a parte real é negativa na região do visível. Este resultado é válido no limite em que *a* << λ. Isto é válido até valores da ordem de 12 nm, como apresentado na Figura 3a, onde se observa uma banda no perfil da intensificação média do campo elétrico local na superfície da nanoesfera de Ag em comprimento de onda da ordem 395 nm, onde o valor de $\varepsilon_1(\omega) \sim 2\varepsilon_0$.

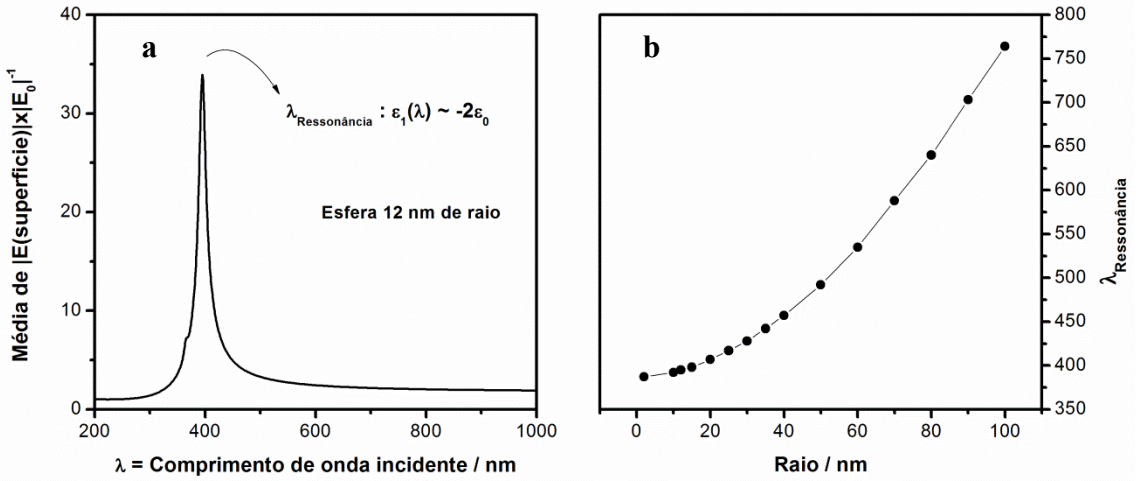


Figura 3: Para nanoesferas de Ag são apresentados a) Média na superfície da amplitude do campo local normalizado pela amplitude do campo elétrico da radiação incidente, onde se observa uma ressonância para comprimento de onda de 395 nm. b) Variação do comprimento de onda de ressonância ($\lambda_{Ressonância}$) em função do raio da nanoesfera.

Para maiores valores de *a* a aproximação eletrostática não descreve bem a realidade das ressonâncias de plasmon de superfície para as nanoesferas. Com o aumento do diâmetro, a

banda referente ao modo dipolar de excitação de plasmon de superfície desloca para o vermelho, como apresentado na Figura 3, mostrando uma grande dependência da ressonância de plasmon com a geometria das nanopartículas e que esta ressonância está na região do visível para nanoesferas de raio até ~100 nm.

A intensificação do campo elétrico na superfície da nanoestrutura, como apresentado na Figura 3a leva a uma intensificação do campo elétrico experimentado pela molécula, levando a uma intensificação do sinal Raman. Além disso, como descrito por Le Ru e Etchegoin [5], a radiação emitida pelo dipolo induzido na molécula é modificada (intensificada) se a mesma encontra-se adsorvida em uma determinada superfície. A intensificação da radiação emitida no caso da molécula adsorvida em nanoestruturas de Ag segue um perfil semelhante ao da ressonância da Figura 3a. De fato, Kerker [22] demonstrou que no caso de excitação com uma onda plana (condição experimental usualmente empregada em medidas SERS) e de nanopartículas de dimensões inferiores ao comprimento de onda desta radiação excitante, a intensificação do campo elétrico da radiação espalhada, $\vec{E}_{espalhado}$, em relação ao campo elétrico da radiação incidente, $\vec{E}_0$, pode ser aproximada à intensificação do campo elétrico local, $\vec{E}_{local}$, em relação a $\vec{E}_0$ na frequência da radiação espalhada (ω_s).[5, 16, 20, 23-25] Neste caso, pode-se escrever para a intensificação SERS (ou fator de intensificação SERS do ponto de vista do mecanismo eletromagnético, EF_{EM}):

$$EF_{EM} = \frac{|\vec{E}_{local}(\omega)|^2}{|\vec{E}_0(\omega)|^2}\frac{|\vec{E}_{espalhado}(\omega_s)|^2}{|\vec{E}_0(\omega)|^2} \approx \frac{|\vec{E}_{local}(\omega)|^2}{|\vec{E}_0(\omega)|^2}\frac{|\vec{E}_{local}(\omega_s)|^2}{|\vec{E}_0(\omega)|^2}$$

Eq. 20

A Eq. 20 é uma das equações mais importantes no tratamento eletromagnético do efeito SERS e é conhecida como aproximação E^4, pois no caso de a frequência espalhada estar muito próxima à frequência da radiação excitante, o fator de intensificação eletromagnético poderia ser aproximado à quarta potência do fator de intensificação do campo elétrico da radiação excitante.

3 – Espectros SE(R)RS no regime de uma molécula

Embora os mecanismos para a intensificação do sinal de moléculas adsorvidas em nanoestruturas metálicas foram apresentados separadamente nesta introdução, as três contribuições podem ocorrer simultaneamente para determinadas condições, como a utilização de corantes que apresentem bandas de absorção na frequência de excitação laser. Neste caso temos o espalhamento Raman ressonante intensificado pela superfície (SERRS), situação que permite altas intensificações no espectro Raman e a detecção do sinal de moléculas em baixos níveis de concentração[‡]. De acordo com Lombardi e Birke, em um esforço para unificar estas três contribuições, a intensidade SERRS apresenta contribuições multiplicativas dos fatores de intensificação devido a estes três efeitos, o que pode ser descrito por termos do tipo [26-27]:

$$\mathrm{I}_{\mathrm{SERRS}} \propto \left[\frac{\langle K|\hat{p}|I\rangle\langle F|\hat{p}|K\rangle\langle I|\left(\partial\hat{H}/\partial Q_k\right)_0|F\rangle\langle i|Q_k|f\rangle}{(\varepsilon_1(\omega)+2\varepsilon_0+i\varepsilon_2(\omega))\left((\omega_{FK}^2-\omega^2)+\gamma_{FK}^2\right)\left((\omega_{IK}^2-\omega^2)+\gamma_{IK}^2\right)} \right]^2$$

Eq. 21

onde $\langle K|\hat{p}|I\rangle$ e $\langle F|\hat{p}|K\rangle$ são os momentos de dipolo de transição para transições entre estados eletrônicos moleculares (contribuição Raman ressonante) e entre o nível de Fermi no metal e o primeiro estado eletrônico excitado (transferência de carga metal-molécula), respectivamente. $\langle I|\left(\partial\hat{H}/\partial Q_k\right)_0|F\rangle$ corresponde ao acoplamento entre os estados eletrônicos $|I\rangle$ e $|F\rangle$ que ocorre devido ao modo vibracional Q_k (acoplamento de Herzberg-Teller). Os estados $|i\rangle$ e $|f\rangle$ são os estados vibracionais inicial e final após o espalhamento. Os termos no denominador correspondem às ressonâncias de plasmon de superfície, de transferência de carga e de transição entre o HOMO e LUMO da molécula, sendo que estas duas últimas

[‡] Embora a presença do efeito Raman ressonante permita a obtenção de elevados fatores de intensificação, a sua existência para uma dada condição experimental não é necessária para a detecção de sinais de moléculas em baixas concentrações, ou até mesmo para a detecção de uma única molécula.

correspondem a alterações no tensor de polarizabilidade Raman e serão agrupadas nesta tese como mecanismo CE.

A extensão da intensificação obtida pelos mecanismos CE e EM é fonte de intensa discussão na literatura. A variedade dos resultados apresentados mostram que na maioria dos casos a contribuição EM é superior à CE, principalmente quando as nanopartículas metálicas estão separadas por distâncias da ordem de 1-2 nm. Nestes casos, os modos de excitação de plasmon de superfície das nanopartículas individuais se acoplam de tal forma que na frequência de ressonância do sistema acoplado os fatores de intensifcações eletromagnéticos podem atigir valores superiores a 10^8 na região de separação entre as nanopartículas, a qual é chamada na literatura pelo termo "*hot spot*". Isto pode ser ser visualizado em uma simulação eletromagnética para um dímero de nanoesferas (a = 25 nm) separadas por 1 nm, apresentado na Figura 4.

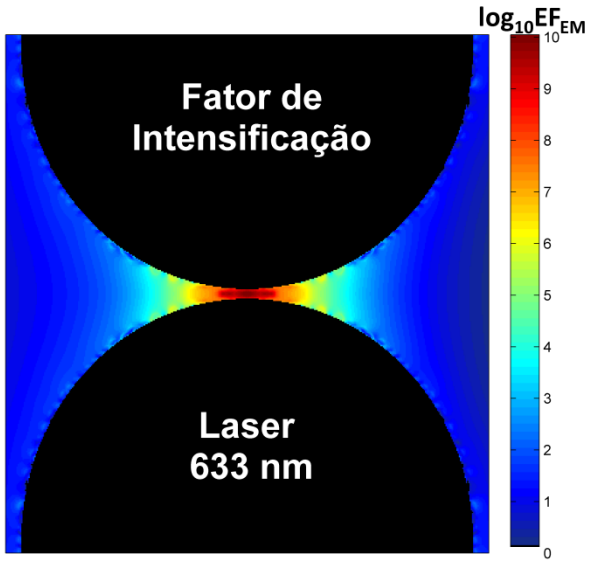


Figura 4: Mapa dos fatores de intensificação (simulados pela Aproximação de Dipolos Discretos apresentada no Capítulo 4 desta tese) nas imediações de um dímero de nanoesferas (a = 25 nm) separadas por uma distância de ~1 nm.

A intensificação da secção de choque Raman por fatores da ordem 10^8 a 10^{10} vezes leva à obtenção de secções de choque comparáveis à secção de choque da espectroscopia de emissão de fluorescência, como indicado na Tabela 1. A espectroscopia de fluorescência é conhecida como uma técnica que atinge um limite de detecção de uma única molécula. A

presença de "*hot spots*" como o da Figura 4 no sistema investigado eleva a técnica SERS ao seleto grupo de técnicas espectroscópicas que permitem tal limite de detecção. Se comparada a técnica de fluorescência, porém, existe uma vantagem que é inerente ao SERS, que diz respeito ao fato de que a técnica permite o acesso a informações mais detalhadas sobre a estrutura molecular, já que espectros vibracionais são assinaturas moleculares. O aumento na secção de choque não é o único fator responsável pela detecção de espectros de uma única molécula por SERS. Outra característica que deve ser mencionada é o avanço na instrumentação e a utilização de detectores CCD de alta performance.

Além do óbvio interesse analítico de se obter espectros SERS de uma única molécula, existem outros atrativos que estão mais relacionados a interesses acadêmicos. Pelo fato de que a obtenção de espectros SERS de uma única molécula está associada às maiores intensificações SERS, a obtenção destes espectros está relacionada às características mais fundamentais da técnica e, portanto, o estudo de espectros SERS neste limite de detecção permite investigar estas características. Por exemplo, pode se investigar as propriedades dos "*hot spots*" quanto à condição de ressonância e intensificação e a influência destes "*hot spots*" nos espectros SERS observados. Além disso, a observação de espectros SERS neste limite de detecção usualmente está associada a intensas flutuações de intensidade, cuja origem e contribuições ainda são temas de investigação na literatura.

Objetivos e organização da tese

Esta tese tem por objetivo investigar as flutuações de intensidades nos espectros SERS em regime de observação de uma única molécula e as contribuições por traz destas flutuações, como por exemplo do potencial aplicado ao metal, concentração, constante de adsorção, distribuição de "*hot spots*" e tipo de "*hot spot*". No que diz respeito à influência do potencial aplicado pode-se utilizar como substrato SERS o eletrodo de Ag ativado por ciclos de

oxidação e redução, com o qual a possibilidade de aplicação de potencial é direta. Este substrato foi amplamente utilizado nos resultados apresentados nesta tese.

Para a interpretação dos resultados buscamos utilizar de métodos numéricos para a simulação de "*hot spots*" e Monte Carlo para a simulação das flutuações de intensidade. Com estes objetivos em mente, os resultados desta tese foram organizados em 4 capítulos. No Capítulo 2 apresentamos resultados obtidos para verificar a possibilidade de detecção de espectros de uma única molécula em eletrodo de Ag ativado por ciclos de oxidação e redução, onde são estudadas flutações de intensidades SERS em diferentes níveis de concentração de moléculas adsorvidas na superfície do eletrodo e potenciais aplicados. No Capítulo 3 apresentamos resultados quanto às flutuações de intensidades relativas anti-Stokes/Stokes obtidas para este substrato, um tema de bastante interesse e discussão na literatura. No Capítulo 4 são discutidas simulações eletromagnéticas efetuadas pelos métodos DDA (Aproximação de Dipolo Discreto) e Teoria de Mie. Estas simulações foram realizadas com o intuito de auxiliar as interpretações dos resultados observados no Capítulo 3. No Capítulo 5, por sua vez, apresentamos resultados de simulações Monte Carlo para o auxílio do estudo das flutuações de intensidades SERS (estudadas experimentalmente nos Capítulos 2 e 3) em diferentes condições, como concentração, constante de adsorção e número de "*hot spots*". Em cada capítulo é apresentada uma pequena introdução (Motivação) com os elementos teóricos mais importantes relacionados ao tema de investigação, seguida por uma descrição sobre os procedimentos experimentais e/ou computacionais envolvidos nos resultados obtidos.

Capítulo 2

Espectros SERS em regime de uma molécula em eletrodo ativado eletroquimicamente

2.1 - Motivação

O limite de detecção de uma única molécula está associado a substratos SERS de alta performance, ou seja, substratos que permitem a obtenção de elevados fatores de intensificação SERS. Estes fatores de intensificação, como já descrito no Capítulo 1 desta tese, correspondem a uma medida de quanto o sinal Raman de uma molécula adsorvida é aumentado devido a presença do metal (nanoestruturado). Porém, diferentes definições de fatores de intensificação são descritas na literatura. Citaremos aqui duas dessas definições, que estão relacionadas ao tema da tese e ao tema deste capítulo especificamente: o fator de intensificação para uma única molécula (SMEF) e o fator de intensificação do ponto de vista do substrato SERS (SSEF).

A definição SMEF descreve a intensificação do sinal Raman de uma única molécula em uma dada posição da superfície, com uma dada orientação em relação ao metal. Isto significa que há um elevado número de variáveis para tal definição, dificultando seu uso prático do ponto de vista experimental [28], o que leva, ao invés de um único número para o SMEF, a determinação de uma distribuição de valores para esta grandeza, a partir da qual é possível se obter, por exemplo, o valor máximo de SMEF, ou seja, a melhor situação quanto o "*hot spot*" onde se encontra a molécula, posição da mesma em relação a este "*hot spot*" e orientação com relação à superfície metálica.[29] De acordo com Le Ru e *col*.[28] SMEF pode ser escrito como:

$$SMEF = \frac{d\sigma_{SERS}}{d\Omega} \cdot \left(\frac{d\sigma_{Raman}}{d\Omega} \right)^{-1}$$

Eq. 22

onde σ_{SERS} e σ_{Raman} correspondem aos valores da secção de choque SERS e Raman, respectivamente, e Ω é o ângulo sólido. A derivada de σ com relação a Ω (conhecida como secção de choque diferencial [5]) descreve o perfil espacial do espalhamento, ou seja, quanto sinal é possível coletar com o detector posicionado em uma determinada região do espaço em relação à posição da molécula. Como o detector não corresponde a um ponto no espaço este perfil de intensificação não poderia ser descrito por um único ângulo θ ou φ (em coordenadas esféricas) em torno da molécula, mas pelo par (θ,φ) = Ω, justificando o uso do ângulo sólido Ω na definição acima. Embora este fator de intensificação seja a definição mais apropriada para o tema desta tese, ou seja, está relacionado à própria medida de espectros SERS de uma única molécula, na maioria dos experimentos SERS esta definição acaba sendo pouco útil do ponto de vista prático, devido às suas complicações experimentais.

O fator de intensificação SSEF, por sua vez, apresenta-se como uma opção mais prática experimentalmente, já que o mesmo tem por objetivo comparar a performance de diferentes substratos metálicos para aplicação em SERS. A definição mais usual encontrada na literatura [28] é

$$SSEF = \frac{I_{SERS}}{N_s} \cdot \left(\frac{I_{Raman}}{N_V} \right)^{-1}$$

Eq. 23

onde I_{SERS} e I_{Raman} são as intensidades obtidas em um experimento SERS e em um experimento Raman normal, respectivamente. N_s e N_V correspondem ao número de moléculas na superfície e no volume investigados pelo laser, responsáveis pelos sinais I_{SERS} e I_{Raman}, respectivamente. N_V pode ser determinado pela concentração em solução (C_{sol}) e pelo conhecimento da geometria confocal do equipamento e abertura numérica das lentes utilizadas. [28]. Um problema, porém, está na determinação de Ns, que no caso do substrato

SERS ser um eletrodo ativado envolve, na melhor das hipóteses, o conhecimento da área do eletrodo iluminada pelo laser (assumindo-se monocamada de moléculas adsorvidas), A_M, o que é feito através de medidas eletroquímicas, que envolvem a área como um todo do eletrodo (não somente a região iluminada). Portanto, a determinação desta área envolve a aproximação de que a mesma é aumentada por um fator de rugosidade que pode ser determinado por medidas eletroquímicas (impedância ou voltametria cíclica). Por outras palavras, a determinação do número de moléculas na superfície (N_s) envolve um número muito grande de aproximações que levam a uma variedade muito grande de valores na literatura, que tornam a sua análise bastante complicada. Le Ru e *col*. [28] propõem uma definição mais apropriada para este fator de intensificação levando em consideração a distribuição de "*hot spots*" na superfície:

$$SSEF = \frac{I_{SERS}}{I_{Raman}} \cdot \frac{C_{sol} H_{ef}}{\mu_M \mu_S A_M}$$

Eq. 24

onde H_{ef} é a altura efetiva do volume de espalhamento e μ_M e μ_S são as densidades de nanoestruturas responsáveis pela intensificação SERS e de moléculas na superfície do metal, respectivamente. A definição na Eq. 24, apesar de mais adequada, ainda apresenta uma grande dificuldade na determinação de μ_M e μ_S.

As duas definições acima, SMEF e SSEF, estão relacionadas a duas condições experimentais que serão amplamente discutidas nesta tese, a começar deste capítulo: a condição de observação de espectros de uma única molécula (regime de SERS de uma única molécula) para o qual são observadas intensas flutuações (temporais e espaciais) de intensidade, e a condição (ou regime) de SERS médio, para o qual não são observadas grandes flutuações de intensidade. Desta forma, a utilização de SSEF é mais apropriada para o caso de regime de SERS médio e é neste contexto que entra a motivação para este capítulo.

Estudos com diferentes substratos SERS indicam que o eletrodo ativado eletroquimicamente, onde um eletrodo liso é submetido a vários ciclos de oxidação e redução (procedimento que gera rugosidade em escala nanométrica) não é um substrato de tão alta performance se comparado, por exemplo, com o coloide do metal em questão.[30] Estas medidas são baseadas nos valores de SSEF obtidos através da Eq. 23 e revelam valores da ordem de 10^6, indicando a impossibilidade de obtenção de espectros de uma única molécula com tal substrato, o que corresponde ao primeiro objetivo deste capítulo, ou seja, investigar a possibilidade de obtenção de espectros de uma única molécula neste eletrodo.

A obtenção de espectros de uma molécula no eletrodo ativado apresenta uma vantagem muito importante sobre o coloide, que diz respeito à possibilidade de acompanhar processos eletroquímicos no nível de detecção de uma única molécula através da técnica SERS. Há muitos relatos na literatura de medidas espectroeletroquímicas (técnica espectroscópica + técnica eletroquímica) no regime de uma única molécula obtidas utilizando-se emissão de fluorescência. A técnica SERS oferece uma vantagem muito grande sobre tais medidas por permitir o acesso a um número de informações muito maior sobre o analito investigado (os espectros vibracionais são encarados como assinaturas da espécie molecular).[5-6] Em um outro aspecto, a presença de um ambiente eletroquímico (possibilidade de variar o potencial do eletrodo) pode ser um elemento importante para o controle da dinâmica de flutuações de intensidade associadas ao limite de detecção de espectros de uma única molécula pela técnica SERS, o que torna a investigação ainda mais interessante em sua essência.

2.2 – Experimental e computacional

2.2.1 - Materiais

As moléculas utilizadas nos experimentos a serem discutidos neste capítulo foram a Rodamina 6G (R6G) e o Vermelho do Congo (CR), cujas fórmulas estruturais são apresentadas na Figura 5.

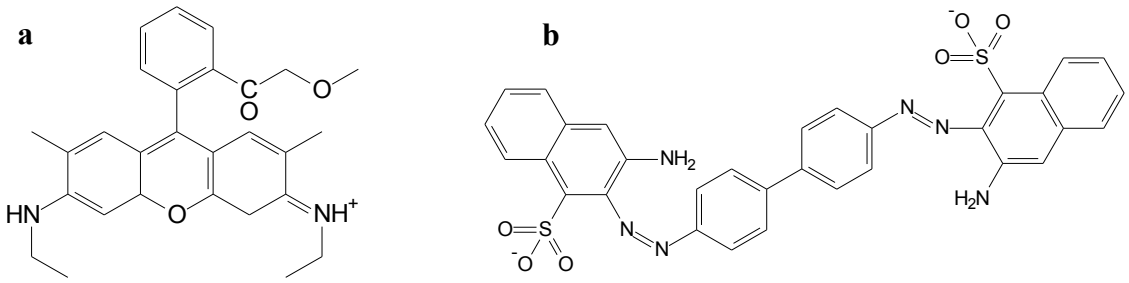


Figura 5: Fórmulas estruturas da Rodamina 6G (a) e do Vermelho do Congo (b).

O substrato SERS utilizado para as medidas foi um eletrodo de Ag ativado eletroquimicamente por ciclos de oxidação e redução em solução 0,1 M de KCl, que foi utilizado como eletrólito suporte.

2.2.2 - Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato-galvanostato EG&G modelo PAR-273A. Os eletrodos auxiliar e de referência foram um fio de platina e Ag|AgCl|$KCl_{(sat)}$, respectivamente. O eletrodo de trabalho consistiu em um cilindro de Ag de diâmetro ~0,13 cm inserido em um cilindro de teflon, permitindo-se somente a área superior do cilíndro de Ag ser exposta. Ao eletrodo de trabalho (devidamente limpo) foram aplicados 3 ciclos de oxidação e redução (ORC) utilizando solução de KCl 0,1 M. O intervalo de potenciais foi *ca*. -0,3 V a *ca*. +0,2 V de tal modo que a densidade de corrente de oxidação estivesse no intervalo 60 a 100 $mA.cm^{-2}$. Este procedimento, bem descrito na literatura [31], leva a um aumento da rugosidade superficial do eletrodo na escala nanométrica a

micrométrica, ou seja, permite a obtenção de nanoestruturas para a intensificação SERS. Este procedimento de ativação foi realizado na ausência de R6G e CR.

2.2.3 - Medidas SERS

As medidas SERS foram realizadas utilizando-se como substrato o eletrodo de Ag ativado por ciclos de oxidação e redução (Ag ORC). Após a ativação do eletrodo soluções aquosas de R6G e CR foram adicionadas à solução de ativação até que a concentração desejada fosse atingida (ver discussão abaixo). O comprimento de onda de excitação foi 632,8 nm de um laser He-Ne (Coherent 31-2140-000), ou seja, fora de ressonância com transições eletrônicas das moléculas, como pode ser visualizado na Figura 6, onde são apresentados espectros de absorção no UV-Vis para os corantes.

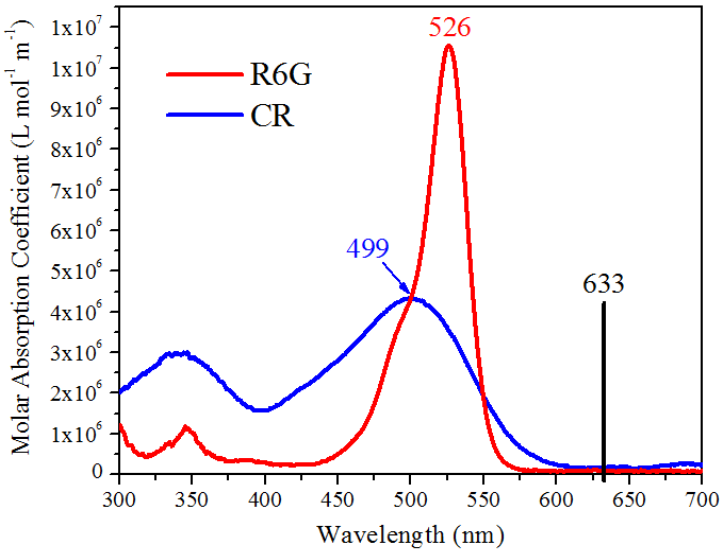


Figura 6: Espectros eletrônicos das moléculas R6G e CR

Os espectros SERS foram obtidos utilizando-se um microscópio confocal Renishaw System 3000 equipado com uma lente de 50 x com abertura numérica NA = 0,5. A potência da radiação laser na amostra foi ajustada para *ca*. 0,8 mW e o diâmetro do laser na amostra era de aproximadamente 2 μm. As concentrações dos corantes utilizadas variaram no intervalo 10 nM a 5 μM. Cada medida na realidade consistiu em uma sequência temporal de milhares de espectros (tipicamente de 1000 a 3000) obtidos com tempo de aquisição de 1 s.

No limite de baixas concentrações (10 nM) os espectros podem apresentar sinais muito baixos e não podem ser observados constantemente em todas as posições na superfície do eletrodo. Desta forma, antes da coleção (temporal) dos espectros, a superfície foi mapeada a procura de uma região na qual características espectrais das moléculas (identificadas e caracterizadas no limite de altas concentrações, 5 μM) pudessem ser observadas. Uma vez que tal região fosse encontrada, a posição do laser permaneceu fixa sobre a mesma para a obtenção dos espectros SERS com o tempo.

2.2.4 - Análise dos dados

O grande número de espectros obtidos em cada experimento torna inviável a análise de cada espectro individualmente. Desta forma, utilizamos de ferramentas estatísticas para o reconhecimento de padrões no conjunto de espectros. Por exemplo, no limite de baixas concentrações existem, na sequência temporal, espectros com intensidades SERS apreciáveis, mas também espectros com bandas de intensidades muito baixas, ou ainda espectros em que nenhuma banda é observada, apenas ruído (isto será discutido mais a frente). Portanto, se faz necessário, antes de qualquer análise, reconhecer os espectros em que são observadas bandas das moléculas e separá-los do conjunto de espectros com somente ruído. Diversas ferramentas estatísticas podem ser utilizadas para o reconhecimento de padrões em um conjunto de dados. Uma dessas ferramentas é a Análise de Componentes Principais (PCA) [32-35], que, como o próprio nome indica, é uma ferramenta de análise de dados multivariados que identifica as características mais importantes (que mais contribuem) para a variância no conjunto de dados.

Brevemente, o conjunto de espectros obtidos é arranjado em uma matriz M, sendo que em cada linha desta matriz são dispostas as intensidades $I_{t_j}^{\omega_i}$ para cada número de onda ω_i no espectro t_j, como apresentado a seguir. No PCA normalmente os dados são padronizados em termos do valor médio, ou seja, efetua-se a subtração do valor médio de cada espectro para se ter a comparação (medida de covariância) entre dados que apresentam média zero, já que o

fundo do espectro apresenta grande contribuição para a variância. Portanto, em M são apresentados os valores de $I_{t_j}^{\omega_i} - \bar{I}_{t_j}$, onde $\bar{I}_{t_j}$ é a média das intensidades no espectro t_j:

$$\bar{I}_{t_j} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} I_{t_j}^{\omega_i}$$

Eq. 25

$$M = \begin{bmatrix} \hat{I}_{t_1}^{\omega_1} & \hat{I}_{t_1}^{\omega_2} & \dots & \hat{I}_{t_1}^{\omega_N} \\ \hat{I}_{t_2}^{\omega_1} & \hat{I}_{t_2}^{\omega_2} & \dots & \hat{I}_{t_2}^{\omega_N} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \hat{I}_{t_T}^{\omega_1} & \hat{I}_{t_T}^{\omega_2} & \dots & \hat{I}_{t_T}^{\omega_N} \end{bmatrix}$$

Eq. 26

A partir da matriz M é calculada a matriz de covariância C entre as colunas de M, onde a covariância (cov) entre as duas primeiras colunas da matriz M (*col*1 e *col*2), por exemplo, seria dada por:

$$\mathrm{cov}(col1, col2) = \frac{1}{(T-1)}\sum_{j=1}^{T} \hat{I}_{t_j}^{\omega_1} . \hat{I}_{t_j}^{\omega_2}$$

Eq. 27

$$C = \begin{bmatrix} \mathrm{cov}(col1, col1) & \mathrm{cov}(col1, col2) & \dots & \mathrm{cov}(col1, colN) \\ \mathrm{cov}(col2, col1) & \mathrm{cov}(col2, col2) & \dots & \mathrm{cov}(col2, colN) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \mathrm{cov}(colN, col1) & \mathrm{cov}(colN, col2) & \dots & \mathrm{cov}(colN, colN) \end{bmatrix}$$

Eq. 28

onde se observa que C é uma matriz quadrada de dimensão NxN e simétrica, e que , portanto, possui N autovetores f_i (Nx1) e N autovalores a_i não-nulos, ou seja:

$$M \times f_i = a_i f_i$$

Eq. 29

Na formação da matriz M e na análise acima estamos pensando que as intensidades SERS formam um espaço vetorial de N dimensões (N valores de ω_i). Portanto, cada espectro na matriz M corresponde a um vetor dentro deste espaço vetorial. Os autovetores f_i correspondem a direções (vetores) em M, ou determinados padrões (características) dos espectros com o tempo. Estes vetores formam uma base neste espaço vetorial, que são

organizados pelos autovalores (covariância), ou seja, de acordo com o quanto descrevem as intensidades SERS em determinados ω_i.

Portanto, se colocássemos os autovalores em ordem decrescente, isto significaria colocar estes vetores (padrões), ou características dos espectros com o tempo, em ordem decrescente de contribuição para intensidade SERS. Ou seja, estes autovetores seriam as características mais importantes no conjunto de dados de intensidades SERS, os quais são conhecidos como componentes principais (PCs). Desta forma, a primeira componente principal PC1 corresponde às características espectrais que levam às maiores intensidades SERS para determinados ω_i no conjunto de espectros. As demais componentes principais levam a um grau cada vez menor de contribuição para intensidades SERS até um certo ponto em que as PCs descrevem apenas o ruído espectral.

A ideia por traz da aplicação do PCA nestes resultados experimentais é de que, pelo fato de que as PCs formam uma base neste espaço vetorial, é possível reconstruir cada vetor, ou seja, cada espectro em M, através de uma combinação linear de PCs.

$$\hat{I}_{t_j}^{\omega_i} = \sum_{a=1}^{N} \chi_a PC_a^{\omega_i} + \bar{I}_{t_j}$$

Eq. 30

onde $PC_a^{\omega_i}$ corresponde ao valor da *a-ésima* PC para o número de onda ω_i e χ_a é o coeficiente da combinação linear, obtido através da multiplicação de M por PC_a, respeitando a característica de combinação linear na Eq. 30 e a ortogonalidade entre autovetores (os PCs)

Portanto, através de um número apropriado de PCs nesta reconstrução é possível, por exemplo, eliminar o ruído dos espectros e, portanto, melhor identificar espectros de intensidades comparáveis ao ruído. Além disso, durante a acumulação dos espectros é possível que exista algum grau de fotodegradação da espécie molecular em estudo, o que pode ser identificado no conjunto de dados e eliminado através do PCA.

A análise de componentes principais foi realizada no ambiente de programação estatística R 2.7.0.[36] Em todas as análises foram escolhidas as componentes principais que descrevem as características espectrais das moléculas R6G e CR observadas no SERS médio. Estas componentes foram, então, utilizadas para reescrever os espectros através de uma combinação linear levando-se em consideração somente estas componentes. Após a análise PCA, as intensidades SERS em função do tempo para determinadas bandas foram analisadas através de histogramas de distribuição de intensidades normalizadas. Esta normalização foi realizada pelo valor médio das intensidades para a banda em questão.

2.3 – Resultados e discussão

Os resultados neste capítulo estão baseados em duas condições: influência da concentração e do potencial aplicado na sequência temporal de espectros SERS de moléculas adsorvidas, as quais serão discutidas em detalhes.

2.3.1 - Influência da concentração na sequência temporal de espectros SERS de moléculas adsorvidas

Na Figura 7 são apresentados espectros SERS em concentrações 500 e 20 nM para a molécula R6G, obtidos em potencial de circuito aberto (~ +0,04 V). Observa-se a característica de espectro bastante ruidoso neste limite inferior de concentrações, porém onde também se observa as assinaturas vibracionais da R6G.

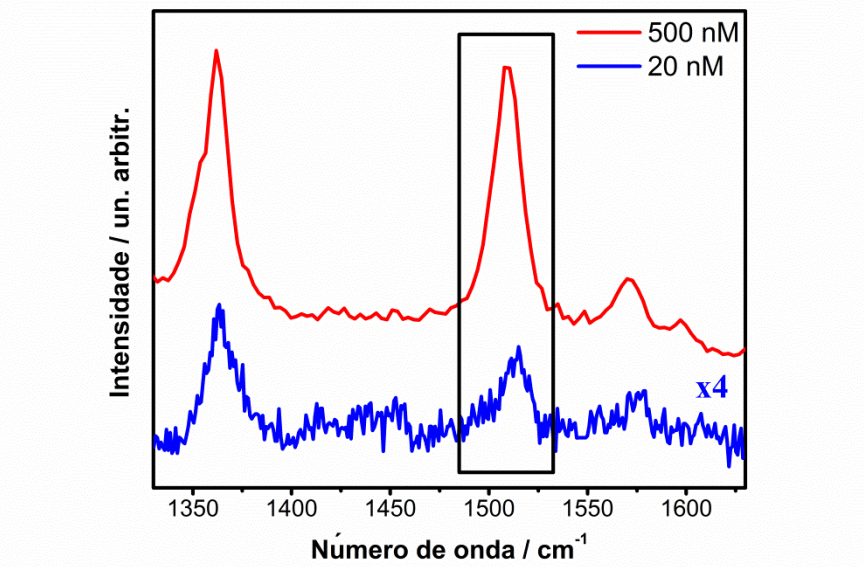


Figura 7: Espectros SERS de R6G em concentrações 500 nM e 20 nM em eletrodo de Ag ORC em potencial de circuito aberto (+0,04 V).

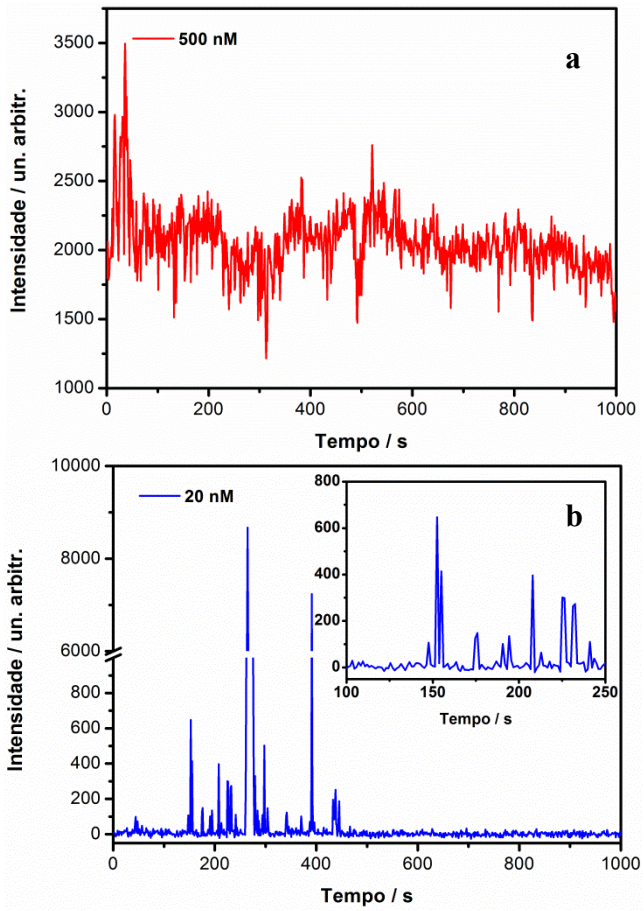


Figura 8: Perfis de intensidade SERS com tempo para a banda em *ca*. 1500 cm-1 da R6G em potencial de circuito aberto para as concentrações 500 nM (a) e 20 nM (b).

O resultado da Figura 7 parece óbvio já que a diminuição na concentração leva a uma diminuição no sinal. Mas o motivo para a comparação na Figura 7 não se limita apenas à observação de um espectro em um baixo limite de concentração, mas está também baseado na

observação dos resultados na Figura 8, onde são apresentados os perfis de intensidade SERS com o tempo para a banda em *ca*. 1500 cm^{-1} demarcada por um retângulo na Figura 7 para as duas condições de concentração: 500 nM (Figura 8a) e 20 nM (Figura 8b).

Os perfis temporais de intensidade na Figura 8 são muito distintos entre si. Para a concentração 500 nM a intensidade SERS para a banda em 1500 cm^{-1} apresenta variações de intensidade, mas que se limitam a um determinado intervalo de intensidades em torno de um valor médio. O fato interessante é que a flutuação de intensidade neste caso não é tão drástica como na Figura 8b, em que a flutuação é tão grande que são observados na sequência temporal um número muito grande de eventos nulos e um número consideravelmente menor de eventos não-nulos. Destes eventos em que se observa uma intensidade SERS diferente de zero para a banda em *ca*. 1500 cm^{-1} há uma enorme variação de intensidades. Observamos espectros com baixa relação sinal ruído como é o caso do apresentado na Figura 7, como também eventos com intensidades bastante elevadas. Esta enorme flutuação de intensidade em que o sinal aparece e desaparece com o tempo é conhecida na literatura como "*blinking*" e é um fenômeno bastante conhecido para a espectroscopia de fluorescência, o que está normalmente associado ao poder desta técnica na detecção de espectros de uma única molécula. [37-40]

Observações como na Figura 8b para o SERS não é uma novidade em sí e os primeiros relatos destas flutuações, devido à semelhança com os resultados para a espectroscopia de emissão de fluorescência, associaram este "*blinking*" a um regime de observação de uma única molécula pela técnica SERS. [41-42] Embora este argumento tenha sido muito debatido na literatura, é aceito que a técnica SERS é capaz de detecção de espectros de uma única molécula. Os objetivos deste capítulo são, então, verificar se de fato estas flutuações observadas para o eletrodo de Ag ORC podem ser associadas a um regime de detecção de uma única molécula e, considerando-se que este é o caso, quais seriam as condições

eletroquímicas que afetam estas flutuações. A origem e as contribuições para estas flutuações de intensidade são tema do Capítulo 5 desta tese e deixaremos por ora esta discussão de lado. Isto se deve ao fato de que os resultados do Capítulo 5 dependem das simulações computacionais que são discutidas no Capítulo 4.

As intensidades SERS de cada espectro foram medidas após o tratamento dos espectros por PCA, ou seja, após eliminação de ruído e de possíveis espectros de produtos de decomposição. Os resultados da análise PCA estão apresentados na Figura 9 (PCs) e Figura 10 (coeficientes da combinação linear (a) e reconstrução do espectro sem ruído - b).

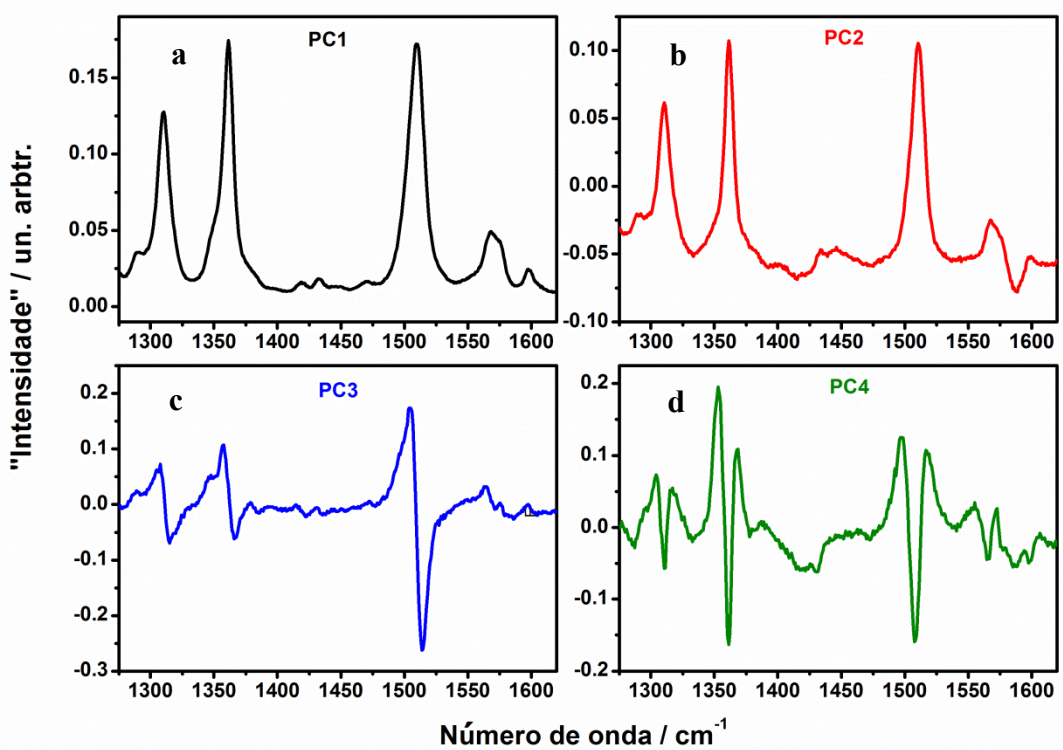


Figura 9: Componentes principais PC1 a PC4 para a sequência temporal de espectros de R6G em concentração 20 nM.

Na Figura 9 são apresentadas as 4 primeiras componentes principais: PC1 (em preto), PC2 (em vermelho), PC3 (em azul) e PC4(em verde). Estas componentes estão organizadas em ordem decrescente de variância. Nota-se que as 2 primeiras componentes principais apresentam perfeita correlação com o espectro SERS da R6G na Figura 7. As componentes PC3 e PC4 apresentam variações que ocorrem nas regiões onde são observadas as bandas da

R6G e, portanto, também descrevem as características espectrais desta molécula, não contribuindo, assim, com novas informações espectrais que já não possam ser descritas pela PC1 e PC2. Estes resultados indicam a possibilidade de descrever os espectros obtidos somente através das componentes PC1 e PC2. Neste caso poderia não haver uma perfeita descrição dos espectros, sobretudo os de maior intensidade, o que necessitaria da inclusão de PC3 e PC4, por exemplo. Os espectros de menor intensidade muitas vezes, após o PCA, apresentam bandas de baixa intensidade onde somente ruído era observado. Para evitar a inclusão de tais efeitos em análises como na Figura 8b, as intensidade SERS foram computadas somente quando o valor estimado (altura da banda) era maior que duas vezes o desvio do ruído. [32]

No caso dos experimentos acima, a PC1 e a PC2 mostraram ser perfeitamente capazes de descrever as principais características dos espectros SERS sem o ruído experimental, como pode ser visualizado na Figura 10b. Na Figura 10a são apresentados os coeficientes da combinação linear em termos de PC1 (eixo x) e PC2 (eixo y) para cada um dos espectros (numerados no gráfico).

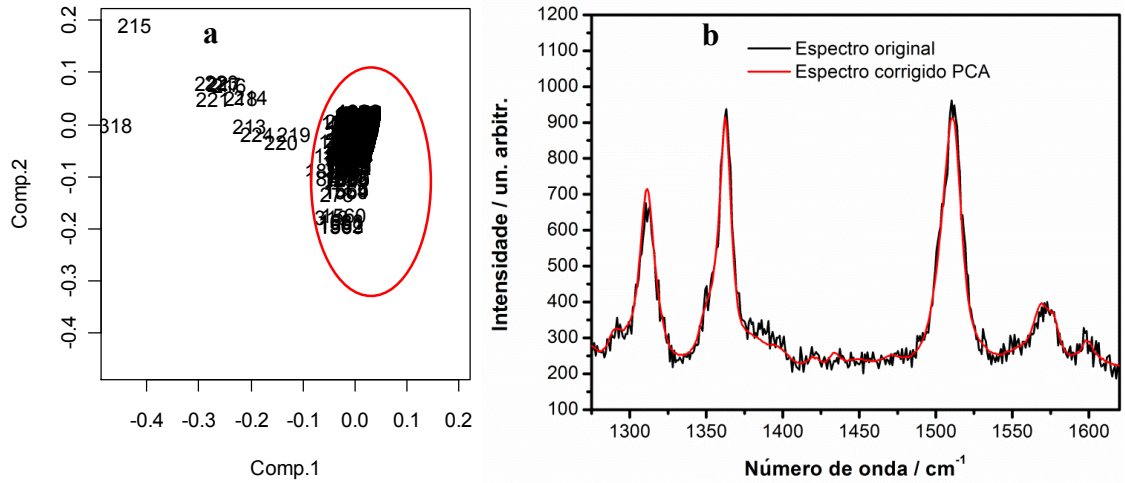


Figura 10: a) Coeficientes da combinação linear das componentes principais PC1 e PC2 (comp.1 e comp.2, respectivamente) para cada espectro da sequência temporal. b) Exemplo da reconstrução de um espectro original através da combinação linear das componentes principais PC1 e PC2.

Na Figura 10a observa-se que grande parte dos espectros estão agrupados em um determinado intervalo de valores para os coeficientes de combinação linear para as

componentes PC1 e PC2 (indicado na figura). Uma inspeção destes espectros revelou que os mesmos não correspondem a espectros da R6G, possivelmente originados por meio de fotodecomposição. Estes resultados mostram uma característica muito importante da técnica PCA, que permite não apenas a remoção de ruído, mas também permite eliminar possíveis espectros de produtos de decomposição, que podem levar a interpretações errôneas para a análise de distribuições de intensidades.

Para analisar a dependência das flutuações de intensidades SERS com a concentração, apresentamos na Figura 11, para diferentes concentrações, histogramas de distribuição de intensidades normalizadas pelo valor médio (na sequência temporal) para a banda em *ca*. 1500 cm^{-1}, como indicado na figura. Estes resultados se referem ao potencial de circuito aberto.

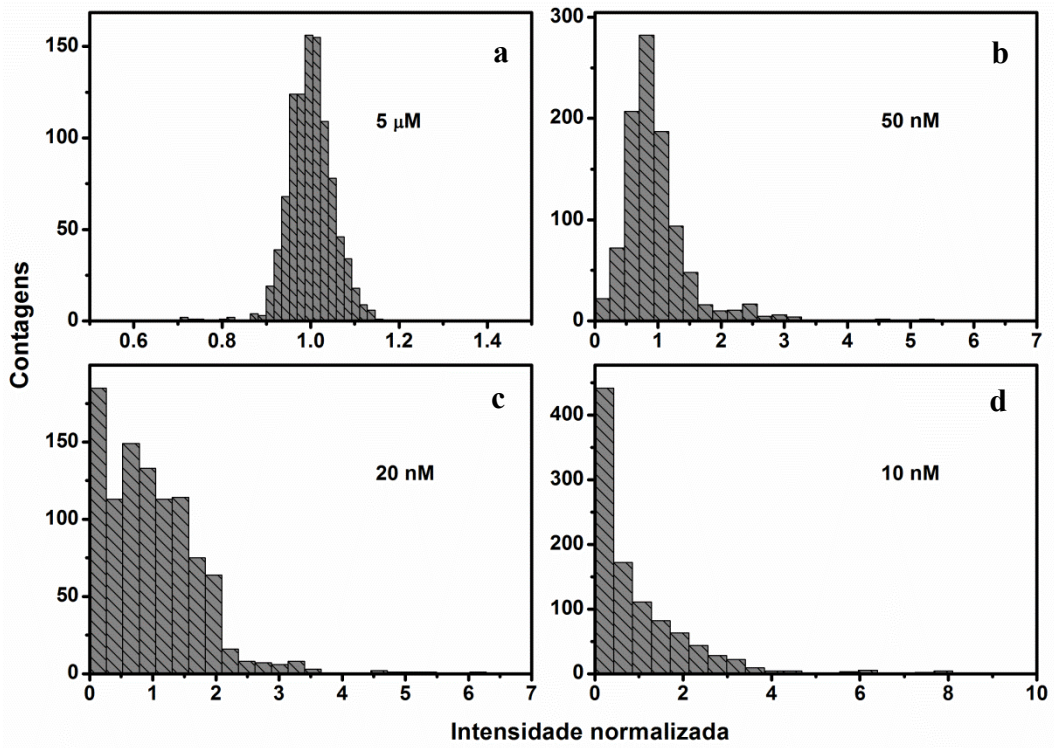


Figura 11: Histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas pelo valor médio da distribuição para diferentes concentrações de R6G. Os espectros foram obtidos em eletrodo de Ag ORC em potencial de circuito aberto.

Na Figura 11 as intensidades foram normalizadas para permitir uma comparação direta entre os histogramas. Observa-se para a maior concentração investigada uma distribuição

normal (Gaussiana) centrada no valor médio da distribuição (Intensidade normalizada = 1). Esta distribuição para concentração de 5 μM apresentou uma largura à meia altura por volta de 0,09, mostrando uma pequena flutuação das intensidades SERS para esta concentração. À medida que a concentração foi diminuída, observou-se um alargamento da distribuição de intensidades, como pode ser observado, por exemplo, para as concentrações 50 nM e 20 nM na figura, o que mostra uma maior flutuação de intensidades nestes casos de menor concentração. As distribuições de intensidade SERS para menores concentrações deixam de apresentar o formato Gaussiano, passando a apresentar um comportamento do tipo lognormal [43]. Nestes casos passamos a observar que a distribuição de intensidades apresenta uma calda para valores de intensidade bastante superiores ao valor médio, se compararmos ao caso da concentração 5 μM. Além disso observamos um aumento significativo do número de eventos nulos (intensidade zero) para a banda em questão, como se pode observar para o caso da concentração 10 nM, em que a distribuição apresenta um formato essencialmente exponencial.

As distribuições de intensidade com um elevado número de eventos nulos como é o caso das concentrações 10 e 20 nM na Figura 11 são associadas à dinâmica de um pequeno número de moléculas adsorvidas na área iluminada pelo laser. Nestes casos, a observação de eventos nulos seriam associadas a ausência de moléculas nos "*hot spots*". Com o objetivo de se verificar tal situação nas condições experimentais acima, estimamos o número de moléculas adsorvidas na superfície através dos parâmetros de adsorção para a R6G em coloide de Ag, estimados por Hildebrandt e Stockburger [44], ou seja, constante de adsorção (K_{ads}) igual a 4.10^4 e cobertura superficial máxima (Γ_{ads}) igual a $4{,}8.10^{14}$ moléculas por cm^2. Considerando-se uma isoterma de adsorção de Langmuir, o número de moléculas adsorvidas por unidade de área (Γ) para uma dada concentração em solução C_{sol} é dada por

$$\Gamma = \Gamma_{\max} K_{ads} C_{sol}$$

Eq. 31

Considerando-se que uma estimativa do diâmetro da área iluminada pelo laser de 2 μm, o que corresponde a uma área iluminada de $\pi.10^{-8}$ cm^2, nós estimamos o número de moléculas de R6G irradiadas pelo laser como sendo $2{,}4.10^6$, $2{,}8.10^5$, $2{,}9.10^4$, $1{,}1.10^4$ e $5{,}8.10^3$ para as concentrações de soluções de R6G iguais a 5 μM, 500 nM (Figura 8a), 50 nM, 20 nM e 10 nM, respectivamente. Apesar destes números serem bastante elevados e, consequentemente, muito acima da realidade de uma única molécula na área iluminada pelo laser, se considerarmos o grau de cobertura para cada concentração (Γ/Γ_{max}) observamos que estes valores são de, aproximadamente, 16%, 2%, 0,2%, 0,07% e 0,04% para as concentrações acima. Ou seja, mesmo para a concentração mais elevada (5 μM) o número de moléculas investigadas está bem abaixo da condição de monocamada.

De acordo com resultados apresentados na literatura e resultados que serão discutidos no Capítulo 5 desta tese, o "*hot spot*" corresponde a uma região cuja área relativa é de apenas 3-4% da área da nanopartícula [43]. Portanto, se considerarmos este dado e compararmos com as estimativas de grau de cobertura superficial para cada concentração, verificamos que para a concentração de 5μM a cobertura é de cerca de 5 vezes maior que a área do "*hot spot*", o que indica uma alta probabilidade de se ter algumas moléculas aleatoriamente distribuídas em torno do "*hot spot*", o que justifica o formato Gaussiano da distribuição de intensidades, devido à baixa probabilidade de não se ter pelo menos uma molécula no "*hot spot*".

Para a concentração de 500 nM, porém, a cobertura superficial é de *ca*. 2%, ou seja, comparável à área estimada dos "*hot spots*" e, portanto, espera-se um menor número de moléculas distribuídas em torno do "*hot spot*" e, consequentemente, uma maior variação de intensidades conforme a evolução da dinâmica das moléculas adsorvidas com o tempo. Apesar de não se esperar um número grande de eventos nulos, espera-se uma maior flutuação de intensidade, o que de fato é observado na Figura 12.

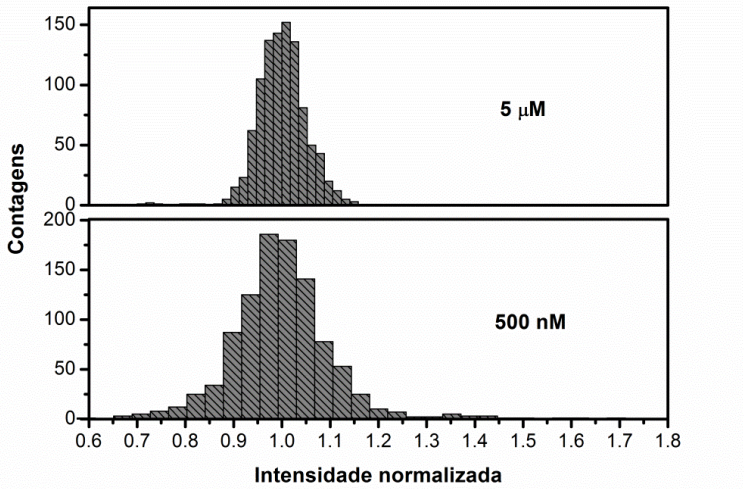


Figura 12: Histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas pelo valor médio da distribuição para soluções de R6G 5 μM e 500 nM em potencial de circuito aberto.

Para as concentrações 20 nM e 10 nM, embora milhares de moléculas sejam iluminadas pela radiação laser, as coberturas superficiais de ~0,07 e ~0,04%, respectivamente, são cerca de 2 ordens de magnitude inferior à área dos "*hot spots*", o que indica que para uma determinada nanoestrutura dentro desta área iluminada pelo laser, a probabilidade de se ter uma molécula no "*hot spot*" é muito baixa.

Lembrando que o "*hot spot*" é responsável pela maior parte do sinal SERS observado, estas milhares de moléculas não apresentarão sinais apreciáveis (para detecção) se estiverem fora do "*hot spot*". Como nestas concentrações há uma maior probabilidade de que as moléculas se adsorvam fora do "*hot spot*", esperamos observar mais eventos nulos ou de baixa intensidade do que eventos não nulos ou de alta intensidade, os quais seriam obtidos quando uma ou poucas moléculas atingissem a localização do "*hot spot*". Isto levaria à obtenção de histogramas com um elevado número de eventos nulos, como os observados na Figura 11. Portanto, as grandes flutuações de intensidades observadas para concentrações inferiores à 50 nM de R6G são consistentes com esta idéia de que somente as moléculas no "*hot spot*" contribuem para o sinal SERS nestas concentrações. Além disso, como a área do "*hot spot*" é pequena e também a concentração superficial, o número médio de moléculas no "*hot spot*" deve ser muito baixo (uma ou poucas moléculas), o que indica um regime de

observação de uma molécula neste substrato SERS. Em outras palavras, mesmo com milhares de moléculas sendo iluminadas pelo laser, somente aquela(s) nos "*hot spots*" dão origem ao sinal observado.

Um fato interessante é a concentração em que se observam as flutuações de intensidades correspondentes às interpretações acima de regime de uma ou poucas moléculas. Esta concentração (abaixo de 50 nM) é superior a concentrações utilizadas em experimentos SERS de uma única molécula em substratos de alta performance, como por exemplo o coloide de Ag. Os primeiros relatos de observação de espectros de uma única molécula para o coloide de Ag indicaram a necessidade de concentrações inferiores a 0,1 nM para a R6G [42], ou seja, pelo menos 2 ordens de grandeza inferiores às utilizadas nos resultados apresentados acima. O motivo para isto pode ser entendido em termos da menor eficiência do substrato Ag ORC em relação ao coloide, por exemplo, na intensificação SERS média. Esta eficiência pode ser entendida como sendo resultado do menor número de "*hot spots*" no eletrodo Ag ORC com ressonância em torno do comprimento de onda de excitação (*ca*. 632,8 nm) em relação ao coloide de Ag. A área total de "*hot spots*" iluminada pelo laser será, portanto, tanto maior quanto maior o número de "*hot spots*", o que necessitaria de um número cada vez menor de moléculas na superfície do eletrodo. Como o eletrodo Ag ORC é um substrato de menor eficiência e, portanto, deve apresentar um menor número de "*hot spots*" com ressonância no comprimento de onda do laser, não é necessário a utilização de concentrações tão baixas quanto 0,1 nM, ou inferiores, para se observar as flutuações de intensidade acima. Este resultado será melhor discutido no Capítulo 5 desta tese.

2.3.2 - Influência do potencial aplicado na sequência temporal de espectros SERS de moléculas adsorvidas

Os resultados anteriores sugerem que o eletrodo Ag ORC permite a observação de espectros SERS de R6G no regime de flutuações característico de observação de uma única molécula de R6G. Uma vantagem do eletrodo de Ag ORC sobre o coloide de Ag neste tipo de estudo é a possibilidade de aplicação de potencial para investigar a influência do mesmo nas flutuações de intensidade.

Na Figura 13 são apresentados histogramas de distribuição de intensidade para uma solução de R6G de concentração 20 nM para diferentes potenciais aplicados, como indicado na figura.

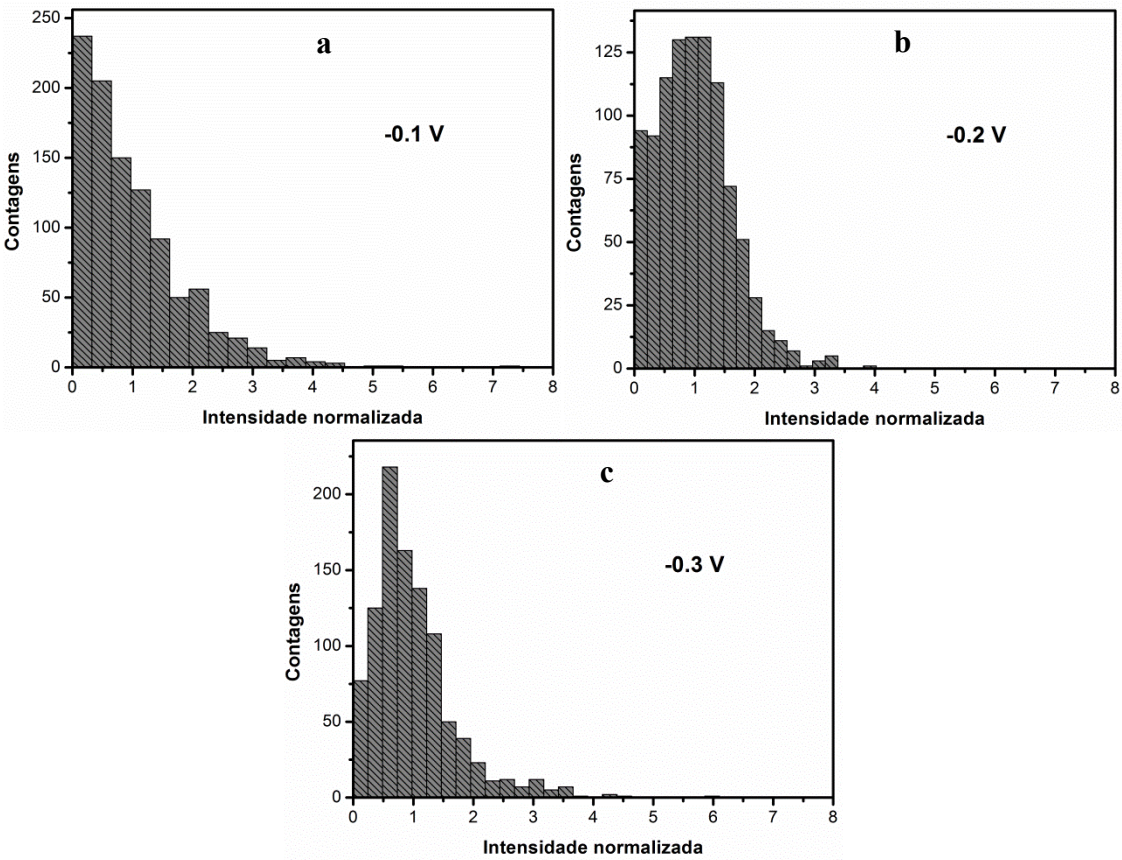


Figura 13: Histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas pelo valor médio da distribuição para a banda em 1503 cm^{-1} da R6G em eletrodo de Ag ORC (concentração de R6G igual a 20nM). Os histogramas se referem a diferentes condições de potencial aplicado, como indicado na figura.

Os histogramas de distribuição de intensidade na Figura 13 apresentam grandes alterações com o potencial aplicado. Para um potencial de -0,1 V o histograma apresenta uma

distribuição com grande número de eventos nulos (intensidade zero), muito parecido com o histograma para o potencial de circuito aberto da Figura 11, o qual foi interpretado como sendo resultante de um pequeno número de moléculas adsorvidas no "*hot spot*". Ao aplicar um potencial igual a -0,2 V o número de eventos nulos diminui e o histograma apresenta um máximo na intensidade média. Para potencial -0,3 V o número de eventos nulos apresenta uma significativa diminuição e a distribuição aparenta ainda mais do que em -0,2 V a uma distribuição do tipo log-normal. Para potenciais mais negativos observou-se uma tendência de uma distribuição normal. Os resultados não são apresentados, pois a partir deste potencial para valores mais negativos o número de eventos não-nulos diminui drasticamente, possivelmente devido à redução da espécie molecular adsorvida ou desorção de cloreto e, consequentemente, da R6G adsorvida via formação de par iônico. Experimentos variando-se o potencial aplicado foram, também, realizados para concentração de 5 μM, mas os resultados não apresentaram variações significativas como no caso de 20 nM.

Os resultados com o potencial aplicado na Figura 13 apresenta uma tendência muito semelhante ao aumento da concentração a partir de 20 nM na Figura 11. Isto sugere que a aplicação de potencial negativo leva a um aumento da concentração superficial de moléculas de R6G, aumentando, portanto, a probabilidade de ocupação dos "*hot spots*" por estas moléculas. Isto ocorre porque de fato a concentração superficial de moléculas adsorvidas pode ser alterada com o potencial aplicado [45]. Neste caso em particular, os resultados indicam que em potenciais mais negativos há um aumento da concentração de R6G na superfície do eletrodo, o que sugere um efeito de interações do tipo atração eletrostática entre a superfície e a R6G, uma espécie catiônica (Figura 5a).

Para verificar esta contribuição de interação entre a molécula e a superfície devido ao potencial aplicado, decidimos realizar experimentos como os acima para a molécula CR, uma espécie aniônica (Figura 5b), para a qual esperamos observar uma tendência oposta da

variação nos histogramas com o potencial aplicado. O espectro SERS do CR é apresentado na Figura 14, onde é demarcada a banda em *ca.* 1590 cm^{-1}, a qual será utilizada para a análise das distribuições de intensidade. Observa-se na Figura 14 que é possível a obtenção de espectros SERS desta molécula em concentrações da ordem de 20 nM com boa relação sinal/ruído.

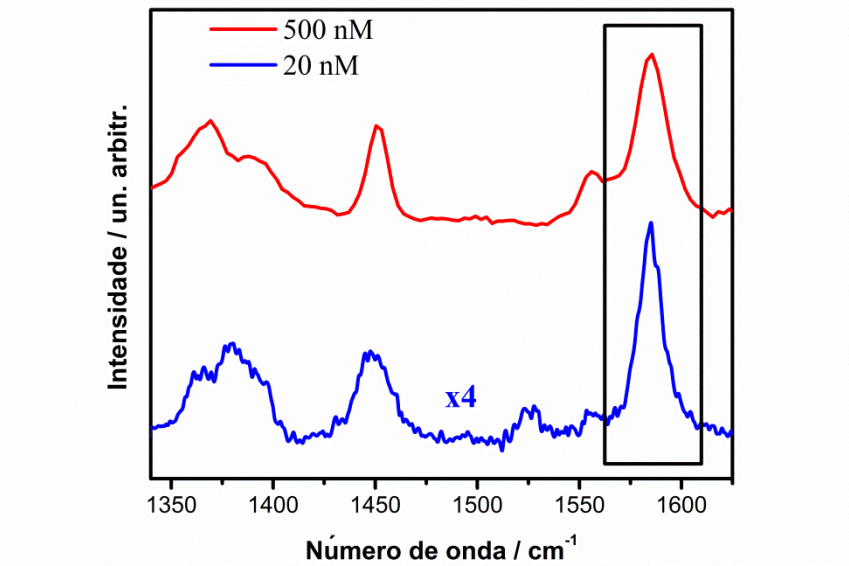


Figura 14: Espectros SERS de CR em concentrações 500 nM e 20 nM em potencial de circuito aberto (~0,4 V).

Ao invés de simplesmente apresentar a dependência dos histogramas de distribuição de intensidade com o potencial aplicado para o CR apenas, efetuamos o experimento para soluções contendo uma mistura de R6G e CR em concentrações 10 nM cada. Este experimento de obtenção de espectros com duas moléculas em solução simultaneamente é conhecido na literatura como "*bi-analyte*", o qual corresponde ao procedimento mais aceito na literatura como prova de detecção de uma única molécula pela técnica SERS. [46-52] A ideia por traz deste procedimento é que na condição de SERS médio, os espectros de uma mistura de duas espécies moleculares apresenta as bandas dos espectros das duas espécies. No caso do regime de observação de uma única molécula, em um dado instante de tempo uma ou poucas moléculas podem visitar um determinado "*hot spot*". No caso de ser uma única molécula, o espectro observado apresentará somente as bandas de uma das moléculas da mistura. Portanto, se analisarmos os espectros SERS neste experimento "*bi-analite*" no regime de

detecção de uma molécula, observaremos uma distribuição de eventos nulos, eventos em que somente bandas de uma ou outra molécula são observadas e eventos em que as bandas das duas moléculas são observadas simultaneamente. À medida que a concentração é aumentada, a distribuição relativa destes eventos muda, no sentido de que o número de eventos nulos e de observação de espectros de uma ou outra molécula diminuem, enquanto o número de eventos em que as bandas das duas moléculas são observadas simultaneamente aumentam.

A vantagem deste experimento é de que em primeiro lugar trata-se de uma "prova" de que o regime de observação de uma única molécula realmente pode ser obtido em um substrato com menor eficiência SERS (médio) como o eletrodo ativado ORC. Em segundo lugar, este experimento permite que os histogramas de distribuição de intensidade para R6G e CR possam ser diretamente comparados, pois são construídos de eventos que são gerados de uma mesma distribuição de "*hot spots*" (mesma área do eletrodo). Para analisar os resultados nestes experimentos foi empregado PCA para identificar os eventos correspondentes a R6G e CR. Os resultados dos coeficientes de combinação para as primeiras componentes principais PC1 e PC2 são apresentados na Figura 15, nos eixos x e y, respectivamente. As componentes PC1 e PC2 são apresentadas na Figura 16 em função do número de onda.

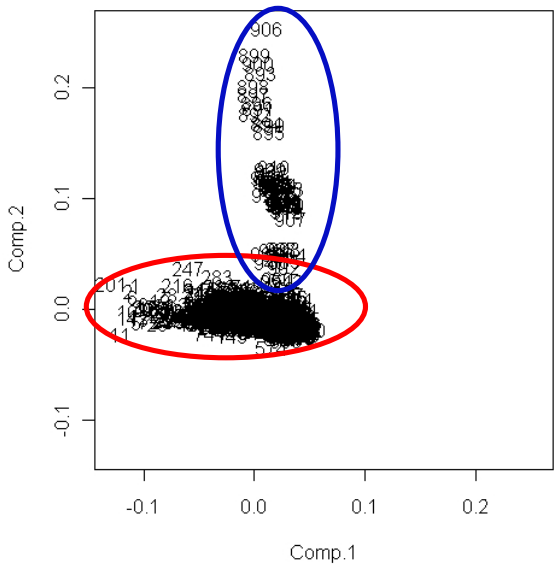


Figura 15: Coeficientes da combinação linear para as componentes principais PC1 e PC2 (comp.1 e comp.2, respectivamente) para o experimento "*bi-analyte*" em potencial de circuito aberto.

Na Figura 15 observa-se que os coeficientes para as componentes PC1 e PC2 (comp.1 e comp.2, respectivamente) para cada um dos espectros se distribuem em dois grupos marcados pelas elipses em azul e vermelho, que se orientam perpendicularmente entre si. Os eventos na elipse vermelha apresentam valores para comp.2 aproximadamente iguais a zero, mostrando que são exclusivamente descritos pela PC1, enquanto que os eventos na elipse azul apresentam comp.1 ≈ 0, indicando que estes espectros são descritos principalmente pela PC2. Analisando-se as componentes principais PC1 e PC2 (Figura 16) verificamos que as mesmas apresentam grande correlação com os espectros do CR e da R6G, respectivamente. Por exemplo, a PC1 apresenta como principal elemento uma banda em ~1590 cm^{-1}, observada no espectro do CR, enquanto que a PC2 descreve bandas em 1500 e em torno de 1370 cm^{-1} encontradas no espectro da R6G. Desta forma, os eventos não nulos na elipse vermelha podem ser associados a espectros do CR principalmente, enquanto que os eventos na elipse azul podem ser associados a espectros em que são observados bandas da R6G, principalmente. Esta interpretação pode ser confirmada através da Figura 17 em que são apresentados espectros retirados das elipses vermelha (a, vermelho) e azul (b, azul), os quais apresentam grande correlação com os espectros SERS de CR (a, preto) e R6G (b, preto) em concentrações 500 nM.

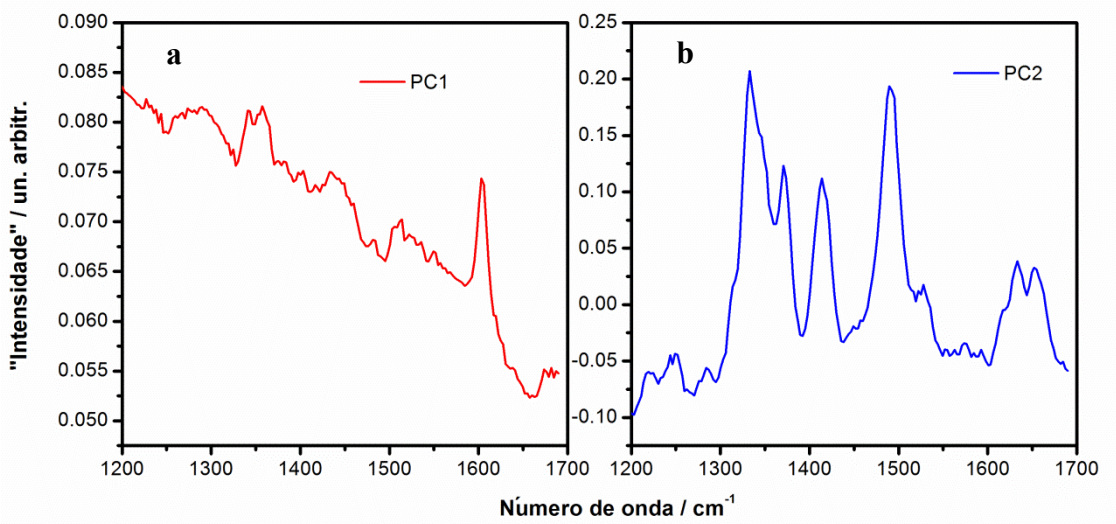


Figura 16: Componentes principais PC1 (a) e PC2 (b) para o experimento "*bi-analyte*" em potencial de circuito aberto.

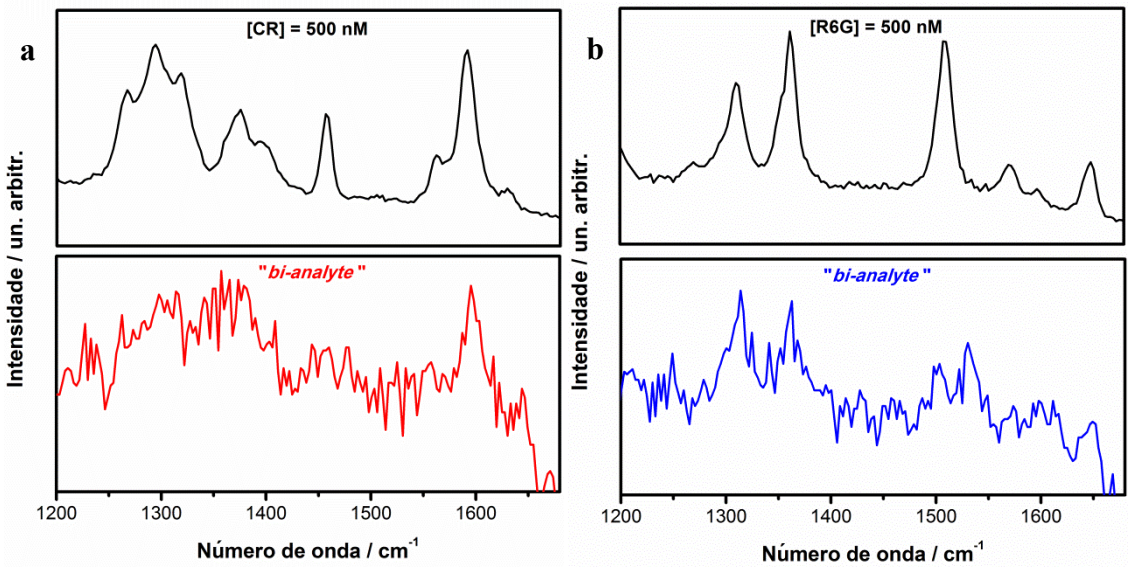


Figura 17: Comparação entre espectros SERS no experimento "*bi-analyte*" com espectros SERS de R6G (a) e CR (b) em concentrações 500 nM (apresentados em preto). Potencial de circuito aberto.

Na Figura 18 são apresentados os histogramas de distribuição de intensidade para as bandas em 1503 cm^{-1} e 1591 cm^{-1} da R6G (a) e do CR (b), respectivamente, em potencial de circuito aberto. Ambos os histogramas se assemelham à condição de poucas moléculas na superfície, com um grande número de eventos nulos, como esperado.

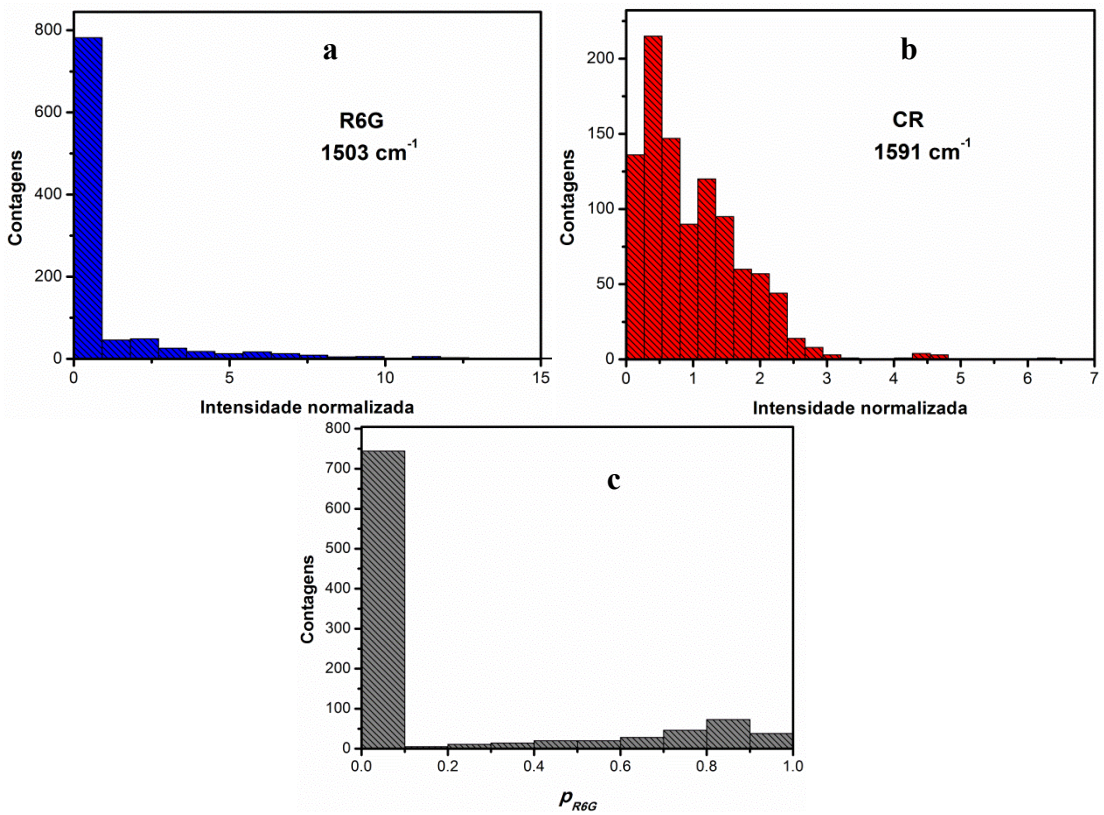


Figura 18: Histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas pelo valor médio da distribuição para as bandas em 1500 cm^{-1} da R6G (a) e 1590 cm^{-1} do CR (b) no experimento "*bi-analyte*" em potencial de circuito aberto. Em c) é apresentado o histograma de porcentagem de sinal corresponde a R6G.

No caso do histograma para a R6G (a) observa-se um maior número de eventos nulos do que no caso do CR (b). Isto se deve a um maior número de espectros correspondentes a CR em relação à R6G (ver Figura 15) na sequência temporal. Isto pode ser devido a diferenças entre as constantes de adsorção das moléculas R6G e CR. Na Figura 18c é apresentado um histograma de fração de sinal correspondente à R6G (p_{R6G}), ou seja, para um determinado espectro se o mesmo é composto somente de bandas de R6G, então, $p_{R6G} = 1$, ao contrário, se somente CR é observado, $p_{R6G} = 0$. Quando as duas bandas são observadas p_{R6G} corresponde a relação entre a intensidade da banda em 1500 cm^{-1} e a soma das intensidades da banda em 1500 cm^{-1} e 1590 cm^{-1}.

O histograma na Figura 18c nos diz se o regime de observação de uma única molécula é ou não observado, o que pode ser verificado se há eventos com $p_{R6G} = 0$ e $p_{R6G} = 1$. Para a condição de SERS médio (baixas flutuações, histograma de distribuição do tipo gaussiano) o número de eventos nestas extremidades é igual a zero e são observados eventos com p_{R6G} em torno de 0,5, considerando-se que as duas moléculas têm as mesmas propriedades quanto à secção de choque Raman e constante de adsorção. Se este fosse o caso, o histograma da Figura 18c seria simétrico, como pode ser observado nos resultado apresentados no Capítulo 5 desta tese.

Para visualizar o efeito do potencial aplicado neste sistema, os histogramas na Figura 19 foram construídos para os potenciais -0,1 V (coluna da esquerda) e -0,2 V (coluna da direita). Em cada linha são apresentados os histogramas de distribuição de intensidade para a R6G (azul) e CR (vermelho), além do histograma de distribuição de p_{R6G} (cinza).

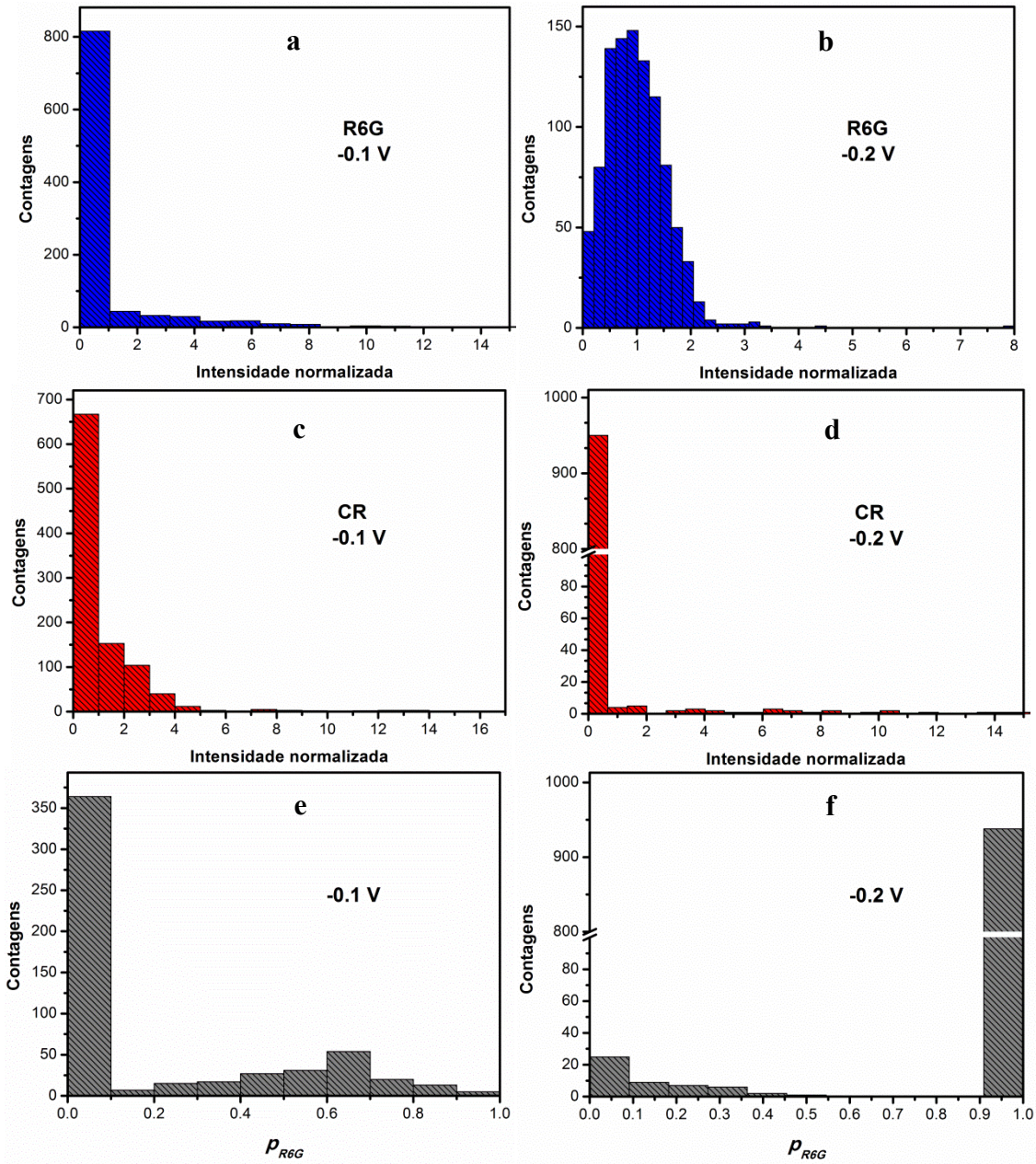


Figura 19: Na primeira linha, em azul, são apresentados os histogramas de distribuição de intensidades SERS normalizadas para a banda em *ca*. 1500 cm^{-1} da R6G no experimento "*bi-analyte*" para os potenciais -0,1 V (esquerda) e -0,2V (direita). Na segunda linha, em vermelho, o mesmo que na primeira, porém para a banda em 1591 cm^{-1} do CR. Na terceira linha, em cinza, são apresentados os histogramas de p_{R6G} para os potenciais -0,1 V (esquerda) e -0,2 V (direita).

Observa-se na Figura 19 uma tendência contrária nos histogramas se compararmos R6G com CR. Para potenciais mais negativos o número de eventos não nulos correspondentes a R6G é maior que para o CR e em potenciais menos negativos observa-se o oposto. Este resultado está de acordo com a interpretação dada para a dependência dos histogramas da Figura 13 com o potencial aplicado. Sendo a R6G um cátion e o CR um ânion, há uma maior interação entre a primeira e a superfície para potenciais mais negativos, enquanto que para o

CR esta interação será maior para potenciais menos negativos. Estes resultados, de acordo com nosso conhecimento, é um dos primeiros a mostrar a obtenção de espectros SERS no regime de uma única molécula em ambiente eletroquímico [30], indicando a possibilidade de se estudar processos eletroquímicos através da utilização deste substrato SERS. Recentemente estudos efetivamente mostraram a possibilidade de seguir processos eletroquímicos utilizando a técnica SERS.[53-54]

2.5 – Conclusões parciais

Os resultados e discussões apresentados neste capítulo trataram de dois pontos bastante importantes na espectroscopia SERS, que foram estudados nesta tese: o primeiro está relacionado à possibilidade de detecção de espectros de uma única molécula utilizando como substrato SERS o eletrodo de Ag ativado por ciclos de oxidação e redução; o segundo está relacionado à possibilidade de investigar as flutuações de intensidades SERS com o potencial aplicado.

A obtenção de espectros SERS no regime de uma única molécula em eletrodo ativado é um resultado muito interessante, pois mostra que não é necessário um substrato de tão alta eficiência SERS (médio) para que este regime de detecção seja atingido. A interpretação por traz destes dados está baseada em assumir que um substrato menos eficiente do ponto de vista SERS médio, na realidade, apresenta uma menor distribuição de "*hot spots*" com ressonância no comprimento de onda da radiação excitante. Porém, a existência destes "*hot spots*" (em maior ou menor quantidade) é o que garante a possibilidade de obtenção de espectros de uma única molécula. A influência na quantidade de "*hot spots*" sugere apenas que a concentração do analito necessária para se observar as flutuações de intesidade ("*blinking*") pode ser maior ou menor dependendo da densidade destes "*hot spots*". Estes resultados abrem um tema para investigação, que trata dos parâmetros que influenciam as flutuações de intensidade, o que corresponde ao conteúdo do Capítulo 5 desta tese.

A dependência das flutuações de intensidade com o potencial aplicado abre a possibilidade de se estudar o efeito do potencial aplicado em outras flutuações observadas no regime de detecção de uma única molécula, como por exemplo, as flutuações de intensidades relativas. Este é um dos temas investigados no Capítulo 3 desta tese, onde o termo intensidade relativa se refere às relações de intensidade anti-Stokes/Stokes neste substrato SERS.

Capítulo 3

Flutuações das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes

3.1 – Motivação

A observação de flutuações de intensidade é (como já discutido anteriormente) uma das observações inerentes à coleção de espectros SERS em regimes de baixas concentrações ou da observação de uma ou poucas moléculas adsorvidas em regiões de alta intensificação do sinal SERS (altos fatores de intensificação SERS). As manifestações mais comuns são de flutuações do tipo aparecimento e desaparecimento de espectros nos domínios espacial e/ou temporal, as quais estão relacionadas à distribuição de "*hot spots*", bem como à posição relativa das moléculas em relação à distribuição do fator de intensificação SERS em cada "*hot spot*". As origens de tais flutuações e suas contribuições ainda são objeto de bastante interesse à comunidade SERS e, por este motivo este tema será tratado mais detalhadamente nesta tese no Capítulo 5.

No Capítulo 2 apresentamos um exemplo para as flutuações temporais de intensidade SERS em eletrodo ativado de Ag. Porém, esta dinâmica de flutuações não se limita apenas ao aparecimento e desaparecimento de espectros, é possível, também, observar experimentalmente flutuações espectrais como aparecimento ou deslocamento de bandas, ou ainda mudanças de intensidades relativas de bandas ao longo do tempo ou em diferentes regiões de uma superfície metálica.

No que se refere às flutuações de intensidades relativas, por exemplo, pode-se citar a observação de flutuações das relações de intensidade de um mesmo modo vibracional quando analisados os lados anti-Stokes e Stokes do espectro SERS. As primeiras observações deste fenômeno por Kneipp e *col*.[55] para espectros SERS das moléculas Cristal Violeta (CV) e R6G em dispersões coloidais em regime de uma molécula, culminaram na identificação de

uma situação em que há um aumento preferencial das intensidades no lado anti-Stokes em relação ao Stokes, sendo que a esta relação de intensidade (anti-Stokes/Stokes) foi atribuída pelos autores o símbolo ρ. Desta forma, os valores de ρ observados pelos autores nos experimentos SERS mencionados acima divergiram bastante dos valores esperados para o caso Raman normal. Apresentamos neste capítulo resultados e uma discussão mais detalhada dessa relação de intensidade para os resultados obtidos nesta tese.

Para guiar a discussão, na Figura 20 é apresentado o espectro Raman de CCl_4 (líquido puro) nas regiões anti-Stokes (lado com número de onda negativo na figura) e Stokes. O sinal intenso centrado em zero corresponde a um resquício do espalhamento Rayleigh que não foi completamente rejeitado pelo filtro utilizado no equipamento[§] em que tal medida foi realizada.

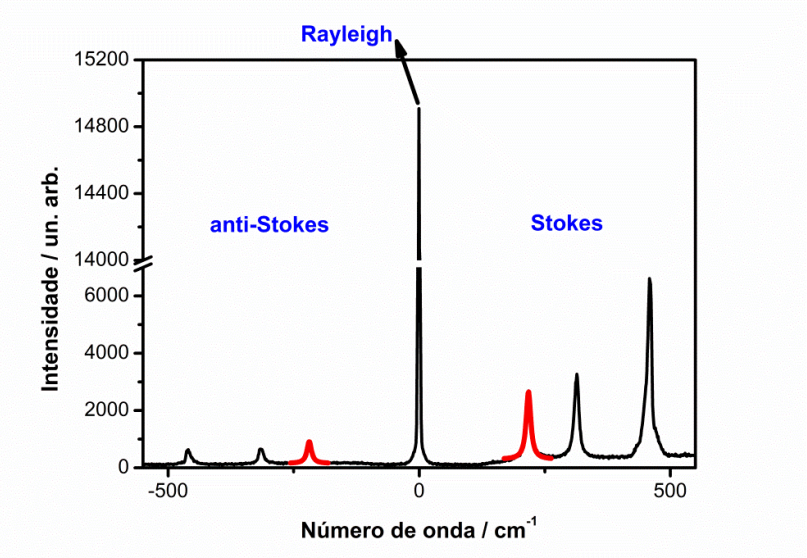


Figura 20: Espectro Raman de CCl_4 nos lados anti-Stokes e Stokes. Potência 400 μW e tempo de acumulação 10s.

O espectro Raman nos lados anti-Stokes e Stokes é simétrico em termos de frequência, uma vez que a mesma informação vibracional (no sentido de atribuição do modo normal) está presente nos dois casos. A única diferença está contida nas intensidades relativas, a qual é devida à estatística de distribuição de moléculas nos diferentes estados vibracionais. Se

[§] As especificações do equipamento utilizado para tal medida são apresentadas no item "**2-Experimental**", abaixo.

considerarmos, por exemplo, a banda em torno de 215 cm^{-1} (marcadas em vermelho) a relação de intensidades (ρ) medida através deste espectro é de, aproximadamente, 0,29. Como esta relação depende da distribuição de Boltzmann, no caso do Raman normal** podemos calcular o valor esperado de ρ e comparar com o experimental e verificar possíveis desvios.

Se considerarmos, por exemplo, uma distribuição de N_1, N_2, N_3..., moléculas nos estados vibracionais v = 1, 2, 3..., respectivamente, para um determinado modo vibracional com energia E_{vib} (ou frequência υ_{vib}), as intensidades nos lados Stokes (I_s) e anti-Stokes (I_{AS}) para aquele modo apresentará uma dependência do tipo:

$$I_S \propto (N_0 + N_1 + N_2 + ...)$$

$$I_{AS} \propto (N_1 + N_2 + ...)$$

Eq. 32

O número de estados vibracionais a serem considerados em cada termo da Eq. 32 será dependente da temperatura e da diferença energética entre os diferentes níveis vibracionais. Por exemplo, para uma banda em *ca*. 215 cm^{-1} deve haver uma apreciável população de moléculas no primeiro estado vibracional excitado à 25ºC. À medida que estados excitados de maior energia são acrescentados nas relações apresentadas na Eq. 32, a variação no valor de ρ se torna cada vez menor, uma vez que $N_0 >> N_1 >> N_2$. Logo,

$$\frac{I_{AS}}{I_S} \propto \frac{N_1}{N_0 + N_1}$$

Eq. 33

Uma vez que a ocupação destes estados vibracionais é um processo dinâmico, dependente da temperatura, é possível escrever equações de velocidade para esta dinâmica, do tipo apresentado na Eq. 34, a seguir:

** Neste capítulo pretendemos mostrar que na presença de efeitos ressonantes, tal relação de intensidades não é exclusivamente dependente da distribuição de Boltzmann a uma determinada temperatura.

$$\frac{dN_0}{dt} = -\gamma_{exc} N_0 + \gamma_{rel} N_1$$

Eq. 34

Onde γ_{exc} e γ_{rel} correspondem às velocidades (taxas) de excitação e relaxação vibracional[††], respectivamente.[56]Considerando-se o caso de estado estacionário:

$$\frac{\gamma_{exc}}{\gamma_{rel}} = \frac{N_1}{N_0} = \beta$$

Eq. 35

A relação (β) entre as taxas de excitação e relaxação a partir de um determinado estado vibracional j, corresponde à probabilidade de ocorrência deste estado, dadas as probabilidades de escape por excitação ou relaxação, as quais são proporcionais à γ_{exc} e γ_{rel}, respectivamente. Esta probabilidade de ocorrência de um determinado estado a uma temperatura T (em K) é dada pela estatística de Boltzmanm [57],

$$\alpha = e^{-E_{vib}/k_B T}$$

Eq. 36

Através das relações apresentadas na Eq. 33 e Eq. 36 podemos escrever a relação entre as intensidades anti-Stokes e Stokes no espalhamento Raman como sendo:

$$\frac{I_{AS}}{I_S} \propto \frac{\alpha}{1+\alpha} = \frac{e^{-E_{vib}/k_B T}}{\left(1+e^{-E_{vib}/k_B T}\right)}$$

Eq. 37

Para completar, incluindo-se a dependência com a frequência da luz espalhada, esta relação de intensidade pode ser escrita como:

[††] Neste ponto, para simplicidade, adotamos o modelo de oscilador harmônico, para o qual os valores de γ_{exc} e γ_{rel} são os mesmos independentemente do número quântico vibracional. Como no caso em questão estamos considerando apenas os estados vibracionais fundamental e o primeiro excitado para descrição das intensidades anti-Stokes e Stokes, a aproximação do oscilador harmônico é uma boa aproximação pelo fato de que estes estados apresentam energias muito próximas ao mínimo da curva potencial para o modo vibracional em questão, para os quais, termos de anarmonicidade não causam efeitos significativos, na maioria dos casos.

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \frac{\sigma_{AS}}{\sigma_S}\frac{(\omega_{exc}+\omega_{vib})^4}{(\omega_{exc}-\omega_{vib})^4}\frac{e^{-E_{vib}/k_BT}}{\left(1+e^{-E_{vib}/k_BT}\right)}$$

Eq. 38

onde σ_{AS} e σ_S são as secções de choque Raman para os lados anti-Stokes e Stokes, respectivamente. ω_{exc} e ω_{vib} são as frequências da radiação incidente e vibracional, respectivamente, em cm^{-1}. No caso do Raman normal, ou seja, na ausência de efeitos ressonantes, as secções de choque anti-Stokes e Stokes são iguais e, portanto, para um determinado modo vibracional, esta relação de intensidades será descrita pela distribuição de Boltzmann. Desta forma, se considerarmos uma banda em *ca*. 215 cm^{-1} o valor esperado para a relação anti-Stokes/Stokes (ρ), obtido através da Eq. 38 (radiação incidente em 632,8 nm) é da ordem de 0,28. O valor experimental obtido do espectro do CCl_4 (Figura 20) considerando a banda de menor energia está concordante com este valor teórico.

Possíveis desvios podem ser obtidos entre o valor experimental e o esperado para esta relação de intensidade nos casos em que há resposta diferencial do CCD para cada um dos lados do espectro Raman e, portanto, este fator deve ser levado em consideração quando na análise das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes. Este não é o caso da medida considerada visto que as radiações espalhadas anti-Stokes e Stokes apresentam energias muito próximas (variação de apenas 400 cm^{-1}). Estes possíveis desvios poderiam ser corrigidos, por exemplo, através do levantamento da curva de resposta do CCD e, consequente normalização dos resultados pela mesma. No caso dos experimentos SERS, por exemplo, uma maneira mais simples para esta correção seria através da normalização pelo resultado obtido no Raman normal. Os desvios em ambos os casos seriam, então, cancelados. Adiantando-nos um pouco em nossa discussão, na análise de nossos resultados neste tema, optamos por fazer esta última normalização, não por necessidade de correção, já que o resultado obtido é bem próximo do

esperado para a banda em 215 cm^{-1} do espectro do CCl_4, mas para ressaltar as diferenças entre os resultados obtidos em condições SERS e no Raman normal.

Relação anti-Stokes/Stokes em condições SERS

Em 1996, Kneipp e col.[55] reportaram resultados da análise das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes para a molécula CV (ρ_{CV}), as quais apresentaram grandes desvios em relação ao esperado para o Raman normal segundo a descrição acima. Para levar em consideração possíveis respostas diferenciais do equipamento nas duas regiões e descontar a diferença energética, os valores de ρ_{CV} foram normalizados pelos mesmos valores na situação Raman normal, condição tomada como referência (ρ_{ref}). A este valor normalizado foi atribuído o símbolo K.

$$K = \frac{\rho_{SERS}}{\rho_{ref}}$$

Eq. 39

Kneipp e col. verificaram que os valores de K apresentaram uma dependência quadrática com a frequência do modo vibracional, de tal forma que para modos de baixa frequência (~500 cm^{-1}) e alta frequência (~1500 cm^{-1}), os valores de K chegavam a atingir aproximadamente uma e duas ordens de grandeza, respectivamente. A interpretação levantada pelos autores é a de que o aumento na secção de choque Raman quando em condições SERS é tão elevado que a população dos diferentes níveis vibracionais é alterada pelo próprio processo de espalhamento SERS (Stokes). A este mecanismo de alteração da população de moléculas nos diferentes níveis vibracionais pela alta eficiência do espalhamento SERS foi atribuído o termo "*Vibrational Pumping*" (VP).

O mecanismo VP apesar de muito contestado e debatido na literatura tem sido demonstrado ser um efeito de elevada importância à baixas temperaturas [56, 58-63]. O efeito VP corresponde a uma perturbação no equilíbrio térmico e, desta forma, sua contribuição relativa ao efeito térmico será maior para temperaturas mais baixas[63].

Uma característica importante nos experimentos SERS no regime de poucas moléculas é a observação de flutuações nos valores de ρ de tal forma que não somente intensificação preferencial para o lado anti-Stokes pode ser observada, mas também para o lado Stokes, contrariando os mecanismos de intensificação VP e térmico, o que leva a necessidade de uma descrição mais completa das contribuições nas relações de intensidades ρ. Uma vez que tal grandeza corresponde a uma relação entre intensidades, contribuições ressonantes no sistema molécula-"*hot-spot*", como as descritas na introdução desta tese, podem ter fundamental importância nos valores de ρ [58, 64]. Neste capítulo serão apresentados alguns resultados obtidos quando na análise das flutuações das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes em condições SERS utilizando eletrodo Ag ORC como substrato. O ponto central desta proposta está na busca das possíveis contribuições ressonantes para estas flutuações de intensidades relativas, como por exemplo, através do potencial aplicado ao eletrodo, o que corresponde a um passo posterior ao que já foi discutido sobre a influência do potencial aplicado ao eletrodo no Capítulo 2 desta tese.

3.2 - Experimental

3.2.1 - Materiais

Os resultados apresentados neste capítulo se referem aos estudos das relações de intensidade anti-Stokes/ Stokes para as moléculas Verde Brilhante (cujo nome será abreviado para BG, do inglês "*Brilliant Green*") e Cristal Violeta (CV). As fórmulas estruturais de cada uma destas moléculas são apresentadas na Figura 21. BG (Aldrich) e CV (Merck) foram utilizados sem efetuar purificações.

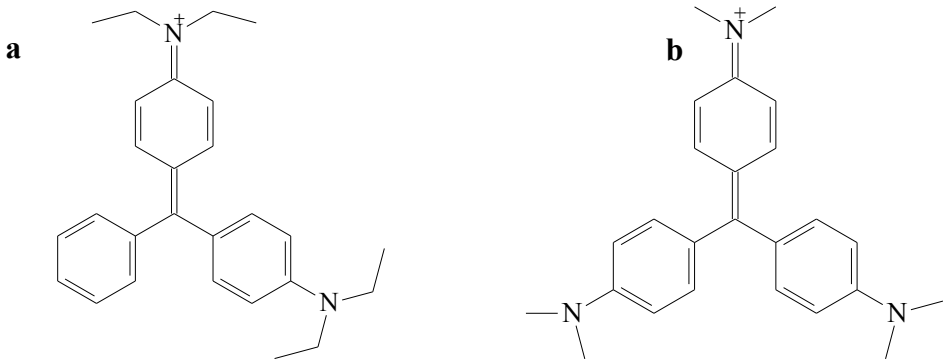


Figura 21: Fórmulas estruturais das moléculas BG (a) e CV (b).

Dois substratos SERS foram utilizados neste tema, a saber, um eletrodo de Ag ativado eletroquímicamente por ciclos de oxidação e redução e um coloide de Ag preparado segundo o procedimento descrito por Lee e Meisel [65].

3.2.2 - Medidas Eletroquímicas

O eletrodo de Ag ativado por ORC foi preparado de forma semelhante ao exposto no Capítulo 2. A única diferença, porém, foi o eletrólito suporte utilizado, KBr 0,1 M ao invés de KCl. Esta modificação foi realizada a fim de se evitar o aparecimento de sinais Raman de ânions adsorvidos à superfície de Ag, os quais podem interferir com as bandas de baixa frequência de cada molécula. Por exemplo, o estiramento Ag^0-Cl^- é observado em *ca.* 215 cm^{-1}[66-68], o que corresponde à mesma região de frequências onde são observadas bandas no espectro Raman dos corantes CV e BG. Lembrando o limite de baixas concentrações para se atingir o regime de observação de uma única molécula (da ordem de nM), a presença destes íons adsorvidos ao metal contribuiria de forma expressiva nas intensidades SERS nesta região de baixas frequências, o que tornaria qualquer análise quantitativa inviável. Íons brometo adsorvidos, por outro lado, levam ao surgimento de uma banda no espectro SERS em *ca*. de 160 cm^{-1} atribuída ao estiramento Ag^0-Br^- [66-68], o qual não deve alterar de forma significativa as intensidades das bandas em *ca.* 200 cm^{-1} do BG e CV, além do fato de que a intensidade desta banda (160 cm^{-1}) é comprometida pela utilização de um filtro de "*notch*" (vide infra) para corte da radiação Rayleigh.

De forma semelhante ao que foi exposto no Capítulo 2, o procedimento de ativação foi realizado na ausência de CV e BG, os quais foram adicionados posteriormente até a concentração desejada.

3.2.3 - Medidas SERRS

O termo SERRS é empregado devido ao fato de que ambos os corantes apresentam transições eletrônicas na região de excitação laser (632,8 nm). Dois tipos de abordagens foram adotadas para a aquisição de espectros. Medidas temporais (I) e medidas por mapeamento de uma área da superfície (II). Para cada uma dessas abordagens, duas condições de concentração foram estudadas para comparação e discussão de resultados: 1.0 μM e 20 nM, às quais associaremos os termos condição de SERRS médio e condição de obtenção de espectros de uma molécula (SM), respectivamente. Em ambos os casos o equipamento utilizado foi um microscópio Renishaw in-Via equipado com uma lente de imersão em água com amplificação de 63x (NA = 0.9). O comprimento de onda de excitação foi 632,8 nm de um laser de He-Ne (Renishaw RL6333). A potência do laser na amostra foi ajustada para aproximadamente 2 μW. Com esta lente e este comprimento de onda, estima-se que a área iluminada na amostra seja da ordem de 1 μm^2. O tempo de integração dos espectros foi de 1 s. Para medição simultânea dos lados anti-Stokes e Stokes dos espectros SERRS, uma rede de difração de 600 l/mm foi utilizada, a qual cobre um intervalo espectral de cerca de 1400 cm^{-1} e, portanto, os espectros adquiridos no modo de rede parada centrada no comprimento de onda do laser, apresentam 700 cm^{-1} de intervalo para cada lado, permitindo a análise das bandas de baixa frequência das espécies moleculares adsorvidas nos lados anti-Stokes e Stokes simultaneamente. Para alguns dos espectros SERRS médio das moléculas BG e CV foi empregado o modo de varredura, quando o interesse estava na identificação do espectro desta molécula para comparação com resultados apresentados na literatura. Neste intuito, uma maior faixa espectral é desejada para uma comparação não apenas das bandas na região de

baixa frequência, mas também da região em torno de 1000 cm^{-1} (região tipicamente reportada na literatura pela presença, na maioria dos casos, de modos com as maiores secções de choque Raman/SERS).

A condição I foi empregada tanto para os experimentos utilizando como substrato SERS o eletrodo ativado ORC quanto para o caso da utilização de coloide de Ag. A condição II, por outro lado, foi utilizada apenas para o caso do eletrodo ativado ORC, com o intuíto de mapear as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes nesta superfície. No caso do estudo espectroeletroquímico do comportamento das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes para a espécie BG (primeira parte dos resultados a serem apresentados), 2000 espectros foram coletados para cada potencial eletroquímico aplicado em um único ponto da superfície do eletrodo ORC (condição I). No caso da condição II, adotou-se o procedimento "*bi-analyte*" em que espectros em uma área mapeada foram obtidos de soluções contendo ambas as moléculas (BG e CV) em concentração 10 nM cada (total 20 nM, semelhante ao utilizado no tema do Capítulo 2).

3.2.4 - Análise dos dados

Os espectros SERRS obtidos foram tratados para remoção de fundo, o que é um característica intrínseca no efeito SERS, sobretudo para o caso de corantes. [47, 69-70] Para remoção deste fundo, utilizou-se o programa COBRA disponibilizado por Galloway e *col.*, o qual é baseado na aplicação da transformada de "*Wavelet*" para reconhecimento e remoção de sinais de baixa frequência (fundo) [69]. Para identificação e separação de espectros com sinais SERRS não nulos dos espectros em que somente são observados ruídos, PCA foi empregado nestes experimentos de forma semelhante ao exposto no Capítulo 2.

Uma vez que os espectros de CV e BG são bastante semelhantes (ambas as moléculas estão na classe dos trifenilmetanos), somente a aplicação do PCA não foi capaz de completamente separar as características espectrais de cada uma das moléculas no caso dos

experimentos na condição II. Neste caso, foi adotada a técnica MPCA (do inglês "*Modified Principal Component Analysis*") que corresponde a uma modificação no algorítmo PCA para separar características estatisticamente independentes. Para o interessado, mais detalhes do MPCA são apresentados no material suplementar da referência [32]. Brevemente, o MPCA corresponde a um conjunto de operações matriciais realizadas nas componentes principais de tal forma que os coeficientes de combinação linear se distribuam ortogonalmente, como foi caso dos resultados PCA apresentados no Capítulo 2 (Figura 15). Ambos, PCA e MPCA, foram realizados através do programa para computação estatística R (versão 2.15.2). [36]

3.3 – Resultados e discussão

3.3.1- Estudo das relações de intensidade anti-Stokes/ Stokes em ambiente eletroquímico: efeito do potencial aplicado.

O mecanismo químico (ou de transferência de carga) descrito no primeiro capítulo desta tese revela uma dependência das intensidades com o potencial aplicado à superfície SERS ativa. De fato, o reconhecimento de tal mecanismo se deve a estudos espectroeletroquímicos de espécies adsorvidas em eletrodos ativados. [10-12, 71-72] A característica fundamental do fenômeno se deve à possibilidade de se ajustar através do potencial aplicado a condição de ***ressonância*** entre a radiação excitante e uma transferência de carga envolvendo estados eletrônicos da molécula e do metal. A palavra-chave ***ressonância*** neste mecanismo nos permite, então, propor a verificação do comportamento das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes com o potencial aplicado para identificação de uma possível contribuição do tipo ressonante, o que constitui o tema desta sessão. Para facilitar a análise e interpretação dos resultados na condição SM, iniciamos primeiramente com uma discussão dos resultados em condição de SERRS médio.

Condição SERRS médio de BG em eletrodo de Ag ORC

Na Figura 22 é apresentado um espectro SERRS de BG obtido na condição de SERRS médio em potencial de circuito aberto (OCP) utilizando o modo de varredura, ao contrário das demais medidas apresentadas nesta secção em que o modo de rede parada foi adotado para obtenção simultânea dos lados anti-Stokes e Stokes.

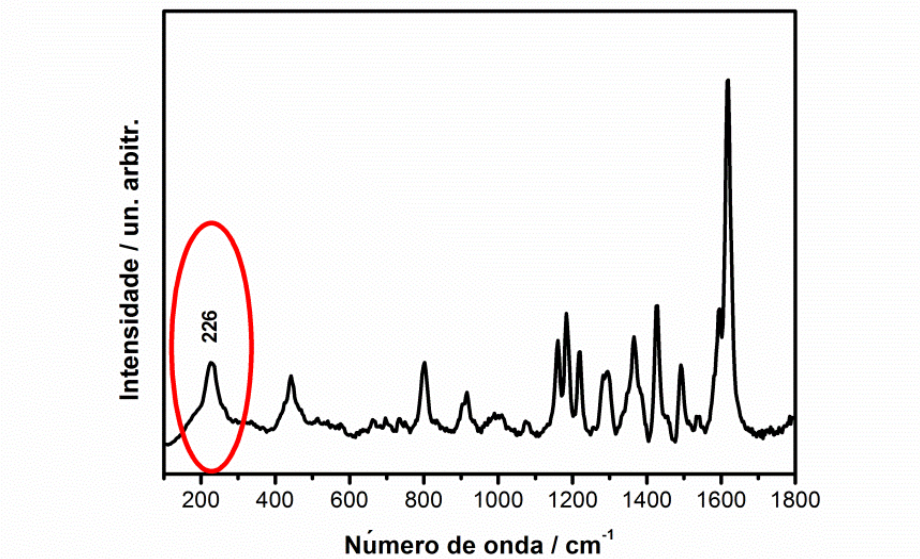


Figura 22: Espectro SERRS médio (~1μM) de BG.

O espectro SERRS do BG na Figura 22 apresenta grande concordância com os espectros reportados na literatura para esta molécula [73], o que indica que nas condições experimentais empregadas (potência e tempo de aquisição) não são observadas impurezas ou decomposição da molécula. Nosso interesse, no entanto, se restringe a região baixa do espectro (abaixo de 700 cm^{-1}) para possibilidade de obtenção de sinais nos lados anti-Stokes e Stokes simultaneamente. Na região mencionada, duas bandas proeminentes são observadas, uma em 226 cm^{-1} e outra em *ca.* 440 cm^{-1}. Para as análises das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes foi escolhida a banda em *ca.* 226 cm^{-1}, cuja frequência é bem próxima à banda para o CCl_4 discutida acima, o que faz deste último um ótimo padrão para análise de possíveis desvios na condição SERRS do comportamento esperado em termos da distribuição de Boltzmann para a referida relação de intensidades. Um histograma destas relações de

intensidade (ρ) é apresentado na Figura 23 para o regime de SERRS médio em potencial de circuito aberto (OCP ~-0,1 V).

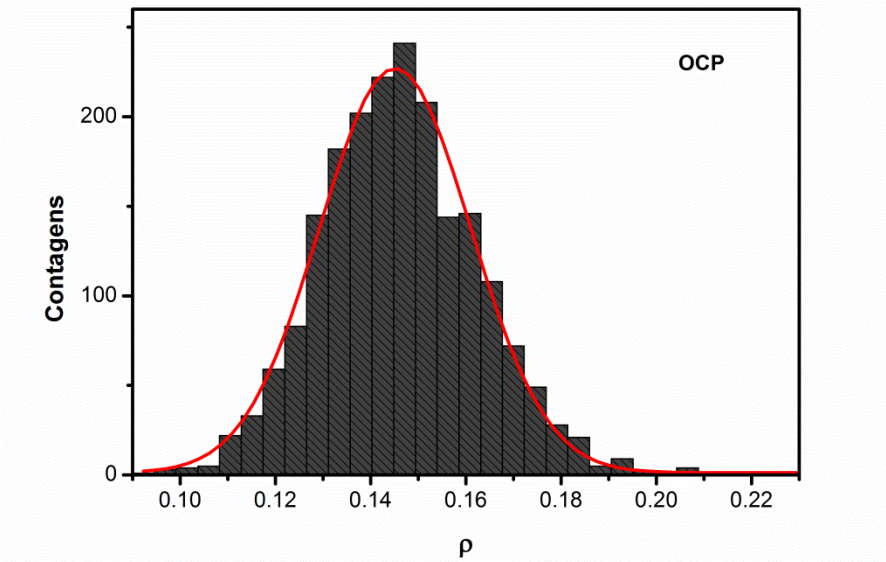


Figura 23: Histograma gerado a partir das medidas das relações anti-Stokes/Stokes (ρ) para uma sequência de 2000 espectros SERRS de BG (~1μM) obtidos em um mesmo ponto da superfície do eletrodo ativado

Nota-se na Figura 23 que a distribuição dos eventos no histograma segue um perfil gaussiano (linha vermelha), com valor médio em torno de 0,15. Esta distribuição é justificada pelo fato de que cada sinal coletado pelo detector corresponde, na verdade, a uma média dos sinais SERRS coletados em toda a área iluminada pelo laser. Por se tratar de uma superfície de alta rugosidade (baixa organização) é esperado na área iluminada pelo laser uma grande variedade de estruturas metálicas com diferentes propriedades plasmônicas e quanto a intensificação do espectro Raman. Pela maneira em que a geração destas estruturas é realizada, não se espera um controle sobre os formatos e tamanhos destas estruturas, de tal modo que estas grandezas se distribuem aleatoriamente na superfície. Portanto, espera-se que as intensidades tanto no lado anti-Stokes como no Stokes, bem como a relação entre estas intensidades, se distribuam da mesma maneira em torno de um valor médio.

Na Figura 23, o valor médio da distribuição (0,15) está abaixo do valor calculado segundo a distribuição de Boltzmann para a temperatura de 25º C (temperatura aproximada para a realização dos experimentos), que é da ordem de 0,29. Isto indica uma intensificação

preferencial para o lado Stokes do espectro em relação ao caso do Raman normal. Este resultado indica que a contribuição VP ("*Vibrational Pumping*") não é efeito predominante nos valores medidos para ρ, já que este mecanismo não explica a intensificação para o lado Stokes do espectro. Desta forma, outro mecanismo deve contribuir (majoritariamente nestes experimentos) para intensificação de um ou outro lado do espectro Raman quando em condição SERRS. Uma possibilidade seria alterações na temperatura quando na condição SERRS.

De forma mais imediata, pode-se pensar em uma a alteração na temperatura local na superfície das nanoestruturas, devido à concentração de campo eletromagnético, o que poderia alterar os valores relativos das intensidades anti-Stokes/Stokes, mas novamente espera-se através deste mecanismo um aumento no valor de ρ, não uma diminuição. Além disso, as nanoestruturas responsáveis pelo efeito SERS estão em contato com dois ambientes bem distintos, o metal maciço por um lado e a solução eletrolítica por outro, o que pode permitir uma dissipação efetiva de calor via metal. Considerando um modelo de esferas de Ag imersas em água, o aumento de temperatura calculado para a potência empregada foi inferior a 1ºC e, portanto, possíveis aumentos de temperatura serão desconsiderados no tratamento a seguir. Uma investigação mais profunda sobre aquecimento local poderia ser efetuada através da análise rigorosa das larguras das bandas nas flutuações de intensidade para diferentes temperaturas. Tal procedimento está fora dos objetivos deste estudo e, não esperamos que a temperatura seja capaz de explicar alguns dos espectros observados, por exemplo, em que a intensidade do lado anti-Stokes é até mesmo mais intensa que do lado Stokes. Portanto, um mecanismo diferente dos citados deve ser invocado para explicação dos efeitos mencionados. Uma possibilidade seria a de uma contribuição ressonante.

A molécula BG pertence à família dos trifenilmetanos, semelhantemente à molécula CV, sendo que esta última apresenta uma contribuição *ressonante* do tipo transferência de

carga entre metal e molécula, que já foi amplamente estudada na literatura. [74-76] Como já descrito anteriormente, esta contribuição de transferência de carga é normalmente investigada através da análise das intensidades SERRS em função do potencial eletroquímico aplicado. Desta forma, podemos investigar a influência deste efeito ressonante nos valores de ρ no regime de SERRS médio para a molécula BG. Os resultados para o intervalo de potenciais de -0,1 V a -0,4 V são apresentados na Figura 24.

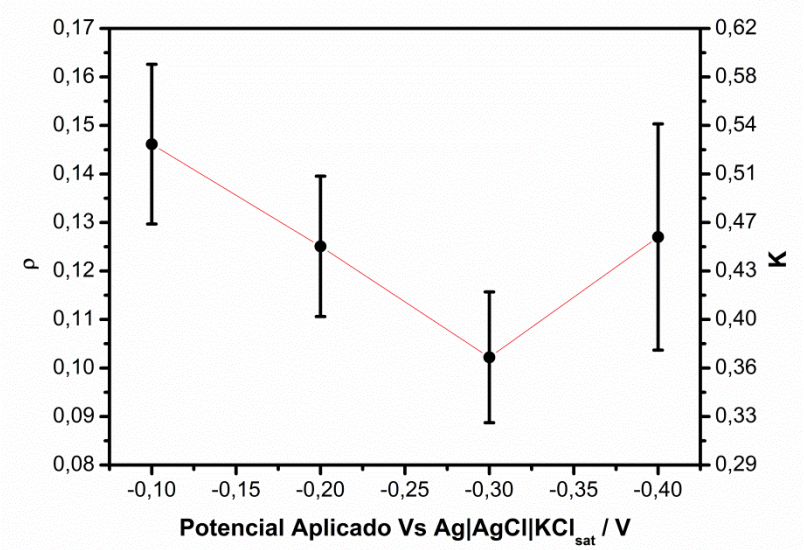


Figura 24: Dependência de ρ (ou K no caso de normalização pelo valor de ρ no Raman normal para o CCl_4) no regime de SERRS médio para BG com o potencial aplicado.

Para cada potencial apresentado na Figura 24 um histograma semelhante ao da Figura 23 foi levantado, revelando uma distribuição normal de forma semelhante ao caso de potencial de circuito aberto. Desta forma, os valores de ρ em função do potencial aplicado na Figura 24 correspondem aos valores médios destas distribuições, sendo a barra de erro na figura o desvio padrão destas distribuições. Nota-se na Figura 24 uma tendência de variação dos valores de ρ em função do potencial, sendo que esta grandeza atinge um mínimo em *ca.* de -0,3 V Vs Ag|AgCl|$KCl_{(sat)}$. Este resultado sugere intensificação diferenciada para os lados anti-Stokes e Stokes em função do potencial aplicado, com uma intensificação preferencial para o lado Stokes em potencial -0,3V. Novamente, este resultado é contrário à expectativa segundo o mecanismo VP, porém, o mesmo apenas sugere a contribuição do potencial

aplicado nos valores de ρ, ou seja, não há evidência nestes resultados que indique de forma clara uma contribuição ressonante do tipo transferência de carga (mecanismo químico). Com o intuito de se encontrar uma melhor evidência para esta contribuição, apresentamos na Figura 25 uma sequência de espectros SERRS médio (obtidos no modo de varredura) em função do potencial aplicado, como indicado na figura.

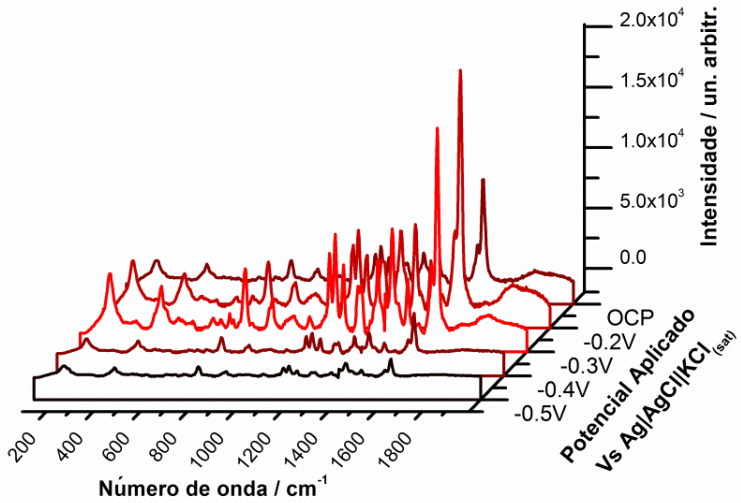


Figura 25: Espectros SERRS médio de BG em função do potencial aplicado.

Na Figura 25 observa-se claramente que a intensidade SERS do espectro como um todo sofre intensificação ao aplicar potencial negativo até *ca*. -0,3V, a partir do qual as intensidades das bandas diminuem para potenciais ainda mais negativos. Ao se comparar este resultado com o perfil de intensificação SERRS com o potencial aplicado para a molécula CV, como reportado na literatura [76], encontramos bastante semelhança entre os dois casos. Para o CV também é observada intensificação do sinal SERRS para potenciais negativos com consequente diminuição de intensidade para potenciais mais negativos, em decorrência de uma desorção redutiva desta molécula, o que leva a uma diminuição da cobertura molecular superficial e, portanto, da intensidade SERRS como um todo. Devido às semelhanças estruturais entre as duas moléculas, inferimos que à semelhança do CV, para potenciais mais negativos que -0,3V, uma desorção redutiva para esta molécula pode ser o causador da diminuição brusca de intensidades a partir de -0,4 V. Esta diminuição de intensidade causada

possivelmente pela desorção da molécula em potencial -0,4V deve ser o motivo pelo qual se observa uma distribuição mais larga no histograma de ρ para este potencial (maior desvio padrão, barra de erro) na Figura 24.

Uma característica importante nos espectros apresentados na Figura 25 é que, apesar de se observar o espectro SERRS como um todo aumentar e diminuir de intensidade com o potencial aplicado, nota-se que os potenciais em que as intensidades máximas são observadas podem variar para alguns modos. Por exemplo, a banda em *ca.* 220 cm^{-1} apresenta máximo em -0,3 V para a sequência de potenciais aplicados, enquanto que a banda em *ca.* 1600 cm^{-1} apresenta máximo em -0,2 V. A Figura 26a apresenta os perfis de intensidades (normalizados) para três bandas nos espectros SERRS da Figura 25, a dizer, 225, 802 e 1620 cm^{-1}. Apesar do baixo número de pontos nos perfis de intensificação, nota-se uma tendência semelhante de intensificação em função do potencial para as bandas em 225 e 802 cm^{-1}, enquanto que para a banda em 1620 cm^{-1}, os resultados indicam que o seu perfil de intensificação está deslocado para potenciais menos negativos, de acordo com o exposto acima.

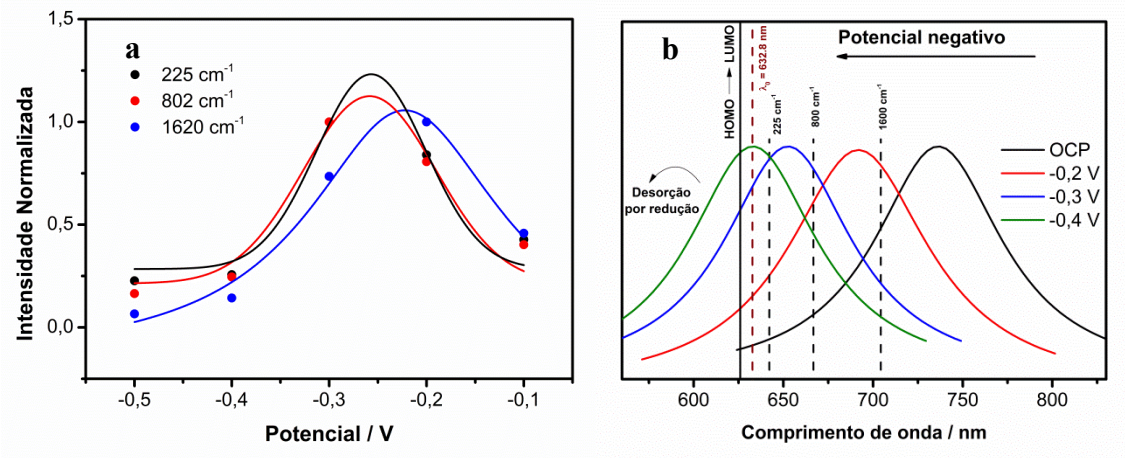


Figura 26: a) Dependência das intensidades SERRS para as diferentes bandas indicadas na figura com o potencial aplicado. b) Modelo esquemático para a variação da condição de ressonância CE com o potencial aplicado.

Como já discutido na introdução, a intensidade SERRS em função do comprimento de onda de excitação (ou do potencial aplicado) depende do perfil do fator de intensificação em função do comprimento de onda, o qual, por sua vez, depende da existência de efeitos

ressonantes. Na presença destes efeitos ressonantes, o fator de intensificação depende da posição relativa entre o comprimento de onda da radiação incidente e da radiação espalhada, sendo que o máximo no perfil de intensidade SERRS é observado quando os comprimentos de onda das radiações incidente e espalhada caem dentro da banda de ressonância. Desta forma, interpretamos os resultados da Figura 25 e Figura 26a de acordo com esta visão de intensificação, ou seja, se considerarmos a banda em 1625 cm^{-1}, por exemplo, cujo comprimento de onda do fóton espalhado é ~704 nm, os dados da Figura 26a indicam que há uma ressonância que engloba este comprimento de onda e o da radiação incidente em 632,8 nm, o que poderia ser atingido, com a ressonância hipotética indicada pela linha vermelha na Figura 26b. Os máximos de intensificação para as bandas em 802 e 225 cm^{-1} segundo esta abordagem deve ocorrer deslocados para menores comprimentos de onda, como indicado pela linha azul na Figura 26b. Desta forma, o potencial aplicado provoca um deslocamento da condição de ressonância, como indicado no esquema da Figura 26b da direita para a esquerda até o ponto em que esta ressonância se aproxima da ressonância eletrônica molecular (transição HOMO→ LUMO na figura). Se considerarmos esta ressonância como de transferência de carga metal-molécula, a linha verde na Figura 26b corresponde a uma situação em que o nível de Fermi do metal se aproxima do LUMO da molécula, o que permitiria transferência efetiva de carga (redução) para a molécula e, possivelmente, desorção da mesma. Esta interpretação da presença de uma ressonância do tipo transferência de carga metal-molécula nos espectros SERRS da Figura 25 está, portanto, de acordo com os perfis de intensificação observados (Figura 26a).

A discussão acima nos leva, portanto, a interpretar o efeito do potencial aplicado nos valores de ρ da Figura 24 como uma manifestação do mecanismo químico (ressonante) nos valores destas relações de intensidade anti-Stokes/Stokes em regime de SERRS médio para a molécula BG. O comportamento de ρ com o potencial aplicado na Figura 24 é bastante

interessante e merece um pouco mais de discussão. Entretanto, deixaremos esta discussão para mais adiante neste capítulo, após um melhor entendimento dos fatores que podem contribuir para os valores de ρ, como por exemplo, a concentração (regime de SERRS médio Vs regime de uma molécula) e o substrato SERS (eletrodo Ag ORC Vs coloideAg). Neste ponto, portanto, discutiremos o comportamento das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes com o potencial aplicado em regime de uma molécula para comparação com os resultados obtidos para SERRS médio de BG discutidos acima.

Condição SERRS em regime de uma molécula em eletrodo de Ag ORC em ambiente eletroquímico

Na Figura 27a é apresentado um histograma de ρ para a molécula BG obtido em condições de observação de espectros de uma molécula. Duas características podem ser notadas neste histograma. A primeira diz respeito ao formato do mesmo, que se assemelha mais a uma distribuição do tipo lognormal do que normal, como foi o caso da Figura 23 para condição de SERRS médio. Para uma melhor comparação entre os dois histogramas, na Figura 27b é apresentado um histograma de κ para as duas condições de concentração (em preto histograma para o regime de uma molécula e em azul histograma para o SERRS médio), onde κ é o valor de ρ normalizado pelo valor médio da distribuição, $\langle \rho_{médio} \rangle$, na condição de SERRS médio (Figura 23):

$$\kappa = \frac{\rho}{\langle \rho_{médio} \rangle}$$

Eq. 40

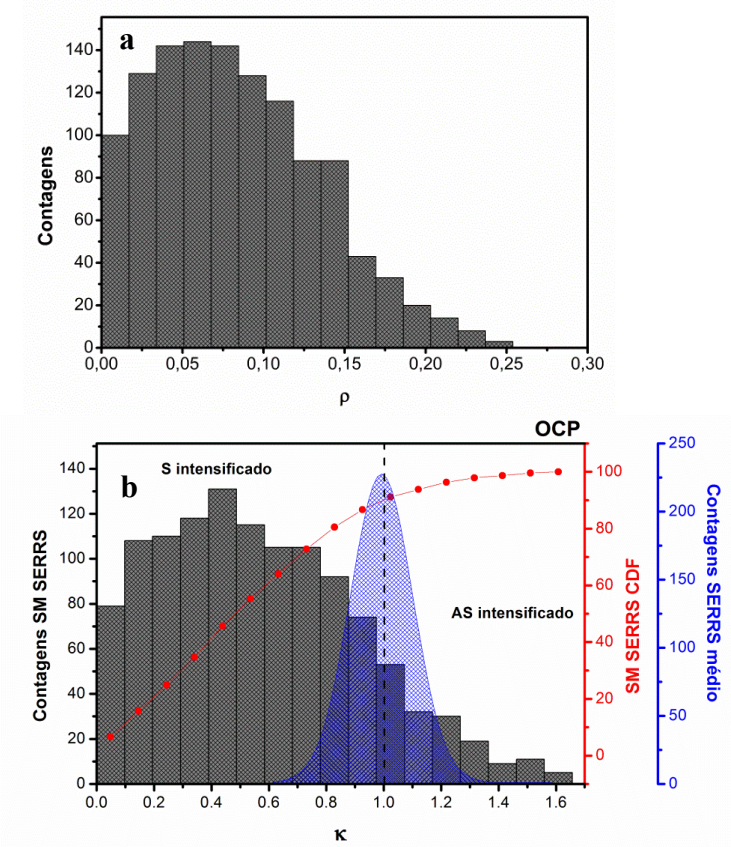


Figura 27: a) Histograma de distribuição de ρ para a molécula BG em potencial de circuito aberto e condição de SERRS de uma molécula. b) Histogramas de distribuição de κ (ρ normalizado pelo valor médio de ρ da Figura 23) para o BG em potencial de circuito aberto em condição de uma molécula (em preto) e em SERRS médio (azul). Em vermelho na figura são apresentados os valores da função de distribuição acumulada de probabilidade (CDF) para os dados no histograma em preto.

No capítulo 2 foram discutidas variações nos formatos dos histogramas com a concentração de analito, onde se observou para concentrações mais baixas histogramas de distribuição de intensidade que têm como característica um formato que tende mais para o tipo exponencial, enquanto que para concentrações mais altas os histogramas tendem mais para o formato gaussiano. Este é o principal motivo para as variações observadas nos formatos entre os dois histogramas na Figura 27b. Além disso, o intervalo de possíveis valores para κ nestes histogramas é interessante. É possível observar eventos em que o lado Stokes é ainda mais intensificado em relação ao SERRS médio (região com $\kappa < 1$), bem como eventos em que o lado anti-Stokes é intensificado em relação ao SERRS médio ($\kappa > 1$), o que indica a influência de alguma contribuição mascarada pelo caráter médio das medidas em altas concentrações. Na Figura 28 apresentamos uma sequência de histogramas dos valores de

κ para diferentes potenciais aplicados. Ao lado de cada histograma é apresentado um espectro com alto κ.

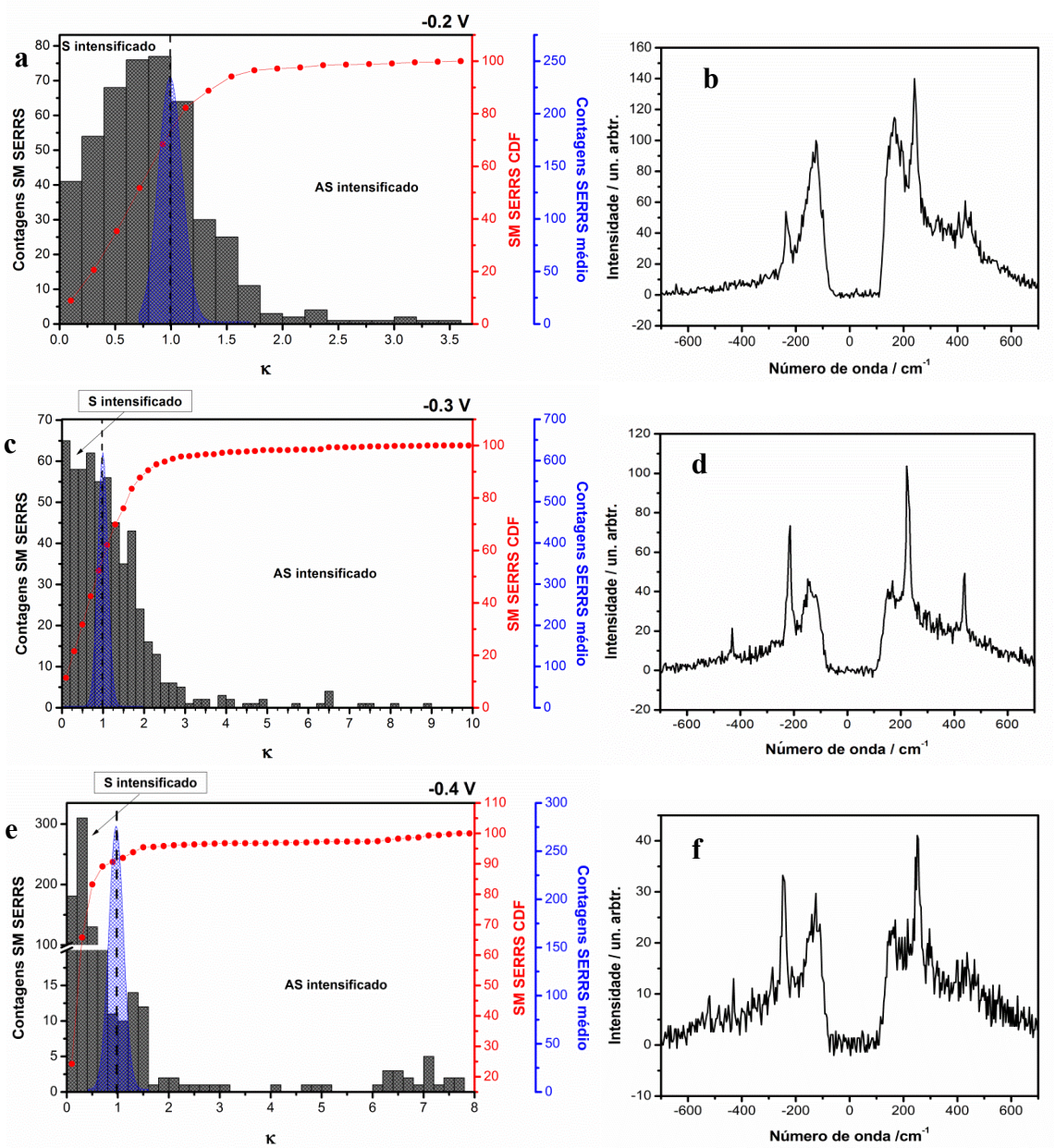


Figura 28: Em cada linha na coluna da esquerda são apresentadas figuras semelhantes à Figura 27b para os potenciais indicados. Na coluna da direita são apresentados exemplos de espectros correspondentes a altos valores de κ no histograma para a condição de uma molécula (em preto).

Analisando-se os dados da Figura 28 observam-se duas variações muito importantes nos histogramas em função do potencial aplicado: 1) variação no formato dos histogramas e 2) variação do intervalo de valores que κ assume.

Quanto à observação 1), verificamos que no regime de uma molécula os histogramas inicialmente do tipo lognormal (OCP) começam a apresentar características de uma tendência

a uma distribuição do tipo exponencial à medida que potenciais mais negativos são aplicados ao eletrodo. Na Figura 28 os histogramas para a condição de SERRS médio são também apresentados para comparação (em azul), os quais apresentam sempre um formato do tipo gaussiano. Além disso, são apresentadas também as funções de distribuição acumulada de probabilidade (CDF, do inglês "*Cummulative Distribution Function*") em vermelho, das quais se torna possível a análise da porcentagem de eventos com Stokes intensificado ($\kappa < 1$) e anti-Stokes intensificado ($\kappa > 1$). Nestes experimentos a distribuição em potencial de circuito aberto apresentou *ca.* 90% de eventos com intensificação para o lado Stokes, ao passo que esta porcentagem é de *ca*. 73%, 57% e 98% para os potenciais -0,2V, -0,3V e -0,4V, respectivamente. Com exceção do potencial -0,4V, a aplicação de potencial negativo sugere o aumento da população de espectros com o lado anti-Stokes intensificado. Este desvio em -0,4V é acompanhado de uma drástica diminuição de eventos não-nulos da sequência temporal de espectros, o que vai de encontro com a interpretação de desorção molecular a partir deste potencial.

O aumento da distribuição de eventos com o lado anti-Stokes intensificado com a diminuição do potencial aplicado sugere duas interpretações: o potencial negativo favorece o lado anti-Stokes, o que é contrário ao observado para o SERRS médio, e/ou o potencial aplicado aumenta a interação (eletrostática) entre molécula e superfície, de forma semelhante ao que foi discutido no Capítulo 2. Este aumento da interação entre molécula e superfície poderia ocasionar um aumento da probabilidade de se ter uma molécula em uma determinada região da superfície com maior afinidade para intensificação do lado anti-Stokes. Como a primeira interpretação é contrária ao observado experimentalmente para o SERRS médio e, não esperamos um comportamento diferente em termos do mecanismo de transferência de carga no nível unimolecular em relação ao SERRS médio, interpretamos que a segunda

hipótese seja a mais provável para descrever as flutuações observadas, ainda mais que o BG é uma espécie catiônica (Figura 21a), assim como a R6G investigada no Capítulo 2.

Quanto à observação 2) acima, de que os intervalos que κ assume são bastante diferenciados nos regimes SERRS médio e de uma molécula, principalmente em potenciais -0,3 V e -0,4 V, sugere a existência de uma nova contribuição para intensificação dos lados anti-Stokes e Stokes, antes mascarada pela média de todas as moléculas adsorvidas na superfície metálica iluminada pela radiação laser. Como a observação destes espectros de uma molécula depende principalmente da presença de "*hot spots*" na superfície metálica, uma interpretação para a extensão que os valores que κ assume é a da contribuição destes "*hot spots*", ou seja, do mecanismo eletromagnético, para intensificação dos lados anti-Stokes e Stokes. Reforçamos que, como não apenas o lado anti-Stokes é intensificado, mas também o Stokes sofre grande intensificação em alguns eventos, o mecanismo VP não será considerado a seguir e, portanto, sugerimos que, à semelhança da interpretação da contribuição da ressonância de transferência de carga para os valores de ρ no SERRS médio, uma contribuição ressonante eletromagnética devido a excitação de plasmon de superfície deve ser o fator "extra" na intensificação dos lados anti-Stokes e Stokes no regime de uma molécula.

3.3.2 - Relações de intensidade anti-Stokes/ Stokes em diferentes substratos SERS: comparação eletrodo ativado e coloide de Ag.

Na Figura 29 apresentamos um histograma das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes para espectros em regime de uma molécula obtidos em coloide de Ag. O objetivo de tal medida é comparar o desempenho de dois substratos SERRS com diferentes características frente a intensificação SERRS, ou mais especificamente, frente ao acoplamento entre a radiação eletromagnética e os modos de excitação de plasmon de superfície.

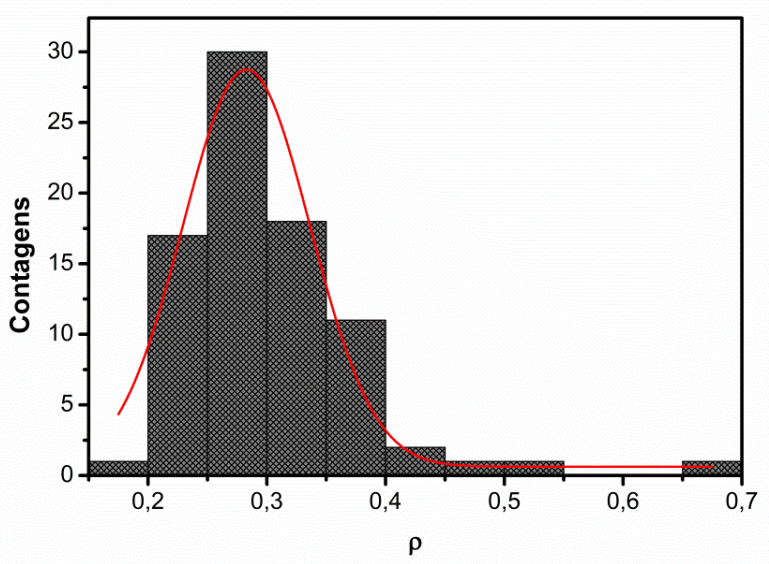


Figura 29: Histograma de distribuição de ρ na condição de SERRS de uma molécula para uma solução contendo BG e CV ("bi-analyte") utilizando-se como substrato SERS o coloide de Ag.

Podemos destacar em um primeiro momento duas características que podem diferenciar substratos metálicos quanto a sua performance SERS: a posição da banda de excitação do plasmon de superfície que permita a maior intensificação para um determinado substrato e sua reprodutibilidade.

O eletrodo ativado ORC, devido o procedimento para sua obtenção, não apresenta controle algum sobre a distribuição das nanoestruturas geradas em sua superfície quanto à formas e tamanhos e, portanto, deve-se esperar para este substrato uma variedade de ressonâncias plasmônicas com diferentes energias de excitação e larguras, cada uma contribuindo para a intensificação do anti-Stokes ou Stokes. Desta forma, uma grande amplitude de eventos com diferentes valores de ρ (ou κ) é esperada no SERS em regime de uma molécula já que cada uma adsorve um destes variados "*hot spots*" por tempo suficiente para que possa ser detectada pelo instrumento. Um substrato com grau um pouco maior de organização, por exemplo, no tamanho das nanoestruturas deve, portanto, levar a uma limitação da amplitude máxima dos valores de ρ, devido a uma menor variação das ressonâncias de plasmon das nanopartículas individuais. Este é, por exemplo, o caso do coloide de Ag, o qual, de fato, apresenta uma menor variação dos valores de ρ, cuja

distribuição é do tipo gaussiana em torno de um valor médio de ~0,3, ou seja, muito próximo ao esperado segundo o mecanismo de população térmica. Isto implica, ainda, que este substrato não é tão eficiente para a intensificação dos lados anti-Stokes ou Stokes para excitação em 632,8 nm. Este aspecto deste substrato será explorado com o auxílio de simulações computacionais no próximo capítulo desta tese.

3.3.3 - Mapeando as energias de ressonância no eletrodo ORC através das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes.

Os resultados apresentados até o momento indicam contribuições ressonantes influenciando as relações de intensidades anti-Stokes/Stokes, as quais dependem do potencial aplicado (mecanismo químico do efeito SERS) e da condição de concentração em que os espectros são obtidos (se SERS médio ou SERS de uma molécula), indicando grande contribuição dos "*hot spots*" (os valores de ρ apresentaram grande flutuação de valores) e, portanto, da ressonância de plasmon de superfície (mecanismo eletromagnético).

Nossa interpretação para estes dados é de que neste regime de baixas concentrações, uma molécula que se adsorve em um determinado "*hot spot*" com contribuições ressonantes que coincidem com o espalhamento Stokes deve apresentar uma intensificação preferencial do lado Stokes. Por outro lado, o espalhamento anti-Stokes seria intensificado, relativamente ao Stokes, quando a molécula "visita" um "*hot spot"* com ressonância deslocada para o lado anti-Stokes do espectro. Portanto, no regime de altas flutuações de intensidade SERS, a distribuição das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes deve ser diretamente correlacionada com a distribuição das energias de ressonância nos "*hot spots*", o que sugere que a investigação destas relações de intensidade permite obter informações à cerca destas energias de ressonância. Com isto em mente, passamos a analisar as distribuições das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes obtidas através de um mapeamento do eletrodo de Ag ORC na condição de observação de uma molécula. Este procedimento de mapeamento ao invés da

aquisição temporal de milhares de espectros apresenta como vantagem o fato de que o laser ilumina cada "*ponto*" da área iluminada por pequeno espaço de tempo, diminuindo a possibilidade de problemas com fotodecomposição (como no Capítulo 2), embora não se tenha observado este problema para os resultados apresentados anteriormente neste capítulo. Além disso, através do mapeamento é possível amostrar um maior número de "*hot spots*", o que permite uma maior confidência estatística, assumindo, é claro, que a distribuição de "*hot spots*" é completamente aleatória devido a característica de superfície desorganizada do substrato.

Os mapeamentos SERRS para análise das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes foram realizados utilizando-se o método "*bi-analyte*" discutido no Capítulo 2 desta tese. Para este experimento utilizou-se as moléculas BG e CV. Na Figura 30 é apresentado um espectro SERRS (médio) do CV na região Stokes do espectro, onde é marcada a banda em 205 cm^{-1}, que será utilizada para análise juntamente com a banda em *ca*. 225 cm^{-1} do BG, como realizado anteriormente.

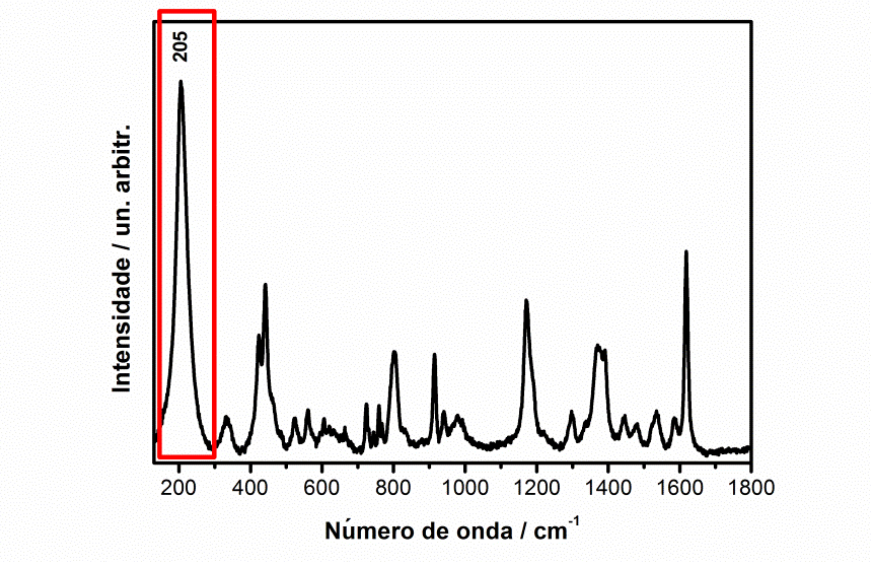


Figura 30: Espectro SERRS médio (~1μM) de CV em eletrodo de Ag ORC.

Condição de SERRS médio:

Antes da apresentação dos resultados dos experimentos SERRS em regime de uma molécula de CV e BG, iniciamos primeiramente com a análise das relações anti-Stokes/Stokes em regime de SERRS médio. Na Figura 31 são apresentados os histogramas das distribuições de ρ para as duas moléculas, BG em verde (ρ_{BG}) a CV (ρ_{CV}) em azul.

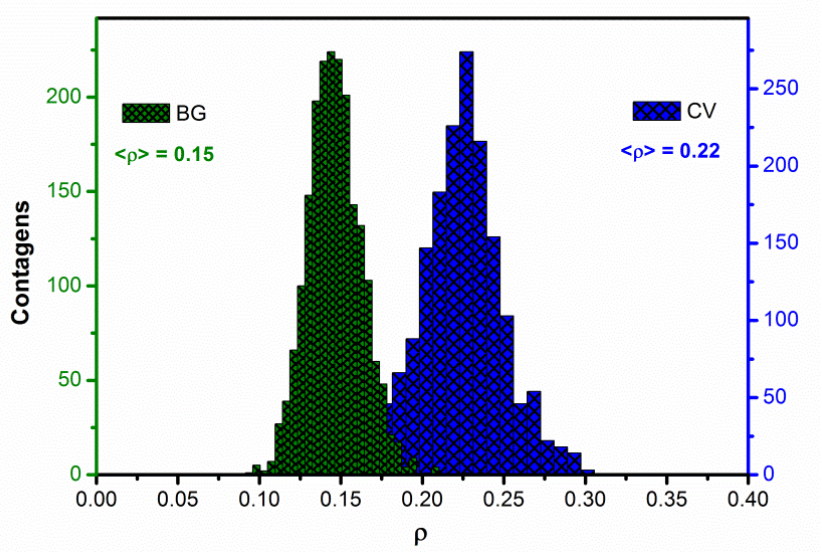


Figura 31: Histogramas de ρ na condição SERRS médio em potencial de circuito aberto para as moléculas BG (em verde) e CV (azul).

Na Figura 31 observa-se que as distribuições de ρ_{CV} e ρ_{BG} são deslocadas entre si. O valor médio da distribuição para o CV é superior ao para o BG e ambos são inferiores ao esperado para o Raman normal (~0,28) e ao obtido para a banda em ~215 cm^{-1} do CCl_4 (0,29), o que mostra uma intensificação preferencial para o lado Stokes dos espectros que geram tais distribuições neste regime de concentrações.

Na Figura 32 são apresentados para comparação os espectros eletrônicos (UV-VIS), onde se observa que os máximos das bandas de transição eletrônica para cada uma das moléculas também são deslocados entre si, sugerindo que a intensificação Raman ressonante será diferente para cada uma das moléculas na frequência da radiação laser.

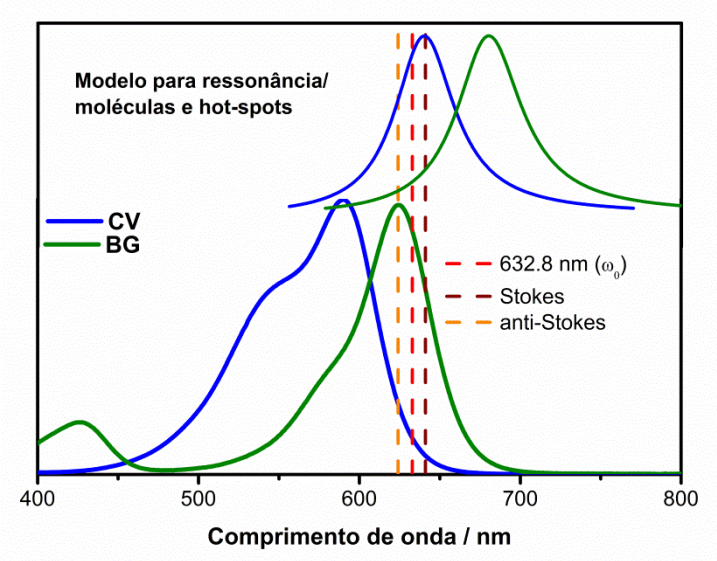


Figura 32: Espectros de absorção no UV-Vis para o BG (em verde) e CV (em azul) são apresentados na parte inferior da figura. Na parte superior são apresentados os modelos das bandas de ressonância CE para estas moléculas adsorvidas em Ag. As linhas verticais tracejadas se referem à radiação excitante em 632,8 nm (em vermelho), e às radiações espalhadas para o lado Stokes (vinho) e anti-Stokes (laranja) para um modo vibracional com frequência em ~215 cm^{-1}.

As linhas tracejadas na Figura 32 mostram os comprimentos de onda da radiação laser e das radiações espalhadas Stokes e anti-Stokes. Nota-se que as bandas no visível de ambos os corantes apresentam um melhor recobrimento com o lado anti-Stokes do que com o Stokes e, portanto, se esperaria um valor de ρ maior que o esperado em termos de equilíbrio térmico (maior que 0,28).[‡‡][77] Contudo, os valores de ρ (valores médios das distribuições da Figura 31) indicam uma intensificação preferencial média para o lado Stokes. Isto sugere que as condições de ressonância que as moléculas BG e CV adsorvidas experimentam estão deslocadas para o vermelho relativamente às transições eletrônicas da Figura 32. Estas novas condições de ressonância são representadas pelas curvas modelo na parte superior da figura. As posições e formatos destes modelos de ressonância foram calculados baseados nos valores experimentais como será melhor descrito a seguir.

Estes resultados permitem a interpretação de que a ressonância experimentada pela molécula adsorvida não pode ser descrita apenas pelas propriedades eletrônicas da mesma. Na

[‡‡] As bandas em *ca*. 200 cm^{-1} dos corantes são atribuídas a uma mistura de contribuições de estiramento e deformação angular entre o átomo de carbono central da molécula e os anéis fenílicos substituídos. Estas vibrações são parte do cromóforo uma vez que as transições eletrônicas no UV-VIS consideradas são atribuídas à transferência de carga dos anéis fenílicos para o átomo de carbono central positivamente carregado.

realidade as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes apresentadas na literatura para o CV em condição de Raman ressonante [78] desviam em muito dos obtidos na Figura 31. Além disso, o fato de que moléculas com diferentes estruturas eletrônicas apresentam diferentes distribuições dos valores de ρ indicam que a excitação plasmônica, apenas, não define a ressonância experimentada pela molécula adsorvida (se este fosse o caso, as moléculas deveriam apresentar a mesma distribuição de ρ). Desta forma, dentro da proposta de interpretação de ressonância, os resultados sugerem que a ressonância experimentada pela molécula é, na realidade, *uma combinação de fatores, possivelmente de transferência de carga, eletrônica (molecular) e plasmônica*, de acordo com a teoria unificada proposta por Lombardi e *col*. [26-27]

Estes resultados e interpretação possibilitam um melhor entendimento microscópico dos resultados para SERRS médio e SERRS em regime de uma molécula discutidos anteriormente. Primeiramente, no regime de SERRS médio todos os "*hot spots*" iluminados pelo laser contribuem para o espectro coletado em maior ou menor extensão, cada um com uma ressonância de plasmon de superfície com energia e largura específicas. Portanto, do ponto de vista de SERRS médio, a contribuição eletromagnética será, na realidade, uma média de todas estas ressonâncias, sendo esta média com característica de banda larga devido à variedade de "*hot spots*" excitados pelo laser. Sendo as radiações espalhadas anti-Stokes e Stokes muito próximas da radiação excitante, espera-se que ressonâncias largas não contribuam para um desnível entre as secções de choque anti-Stokes e Stokes, e o valor de ρ considerando apenas a média dos "*hot spots*" neste regime de concentração deveria ser próximo de 0,28. Porém, na presença de uma ressonância eletrônica molecular e/ou de transferência de carga entre metal e molécula (mecanismo químico, CE), estes valores podem se desviar de 0,28, ou seja, os valores de ρ seriam dominados por estas ressonâncias (mecanismo CE). Uma visão esquemática desta discussão é apresentada na Figura 33.

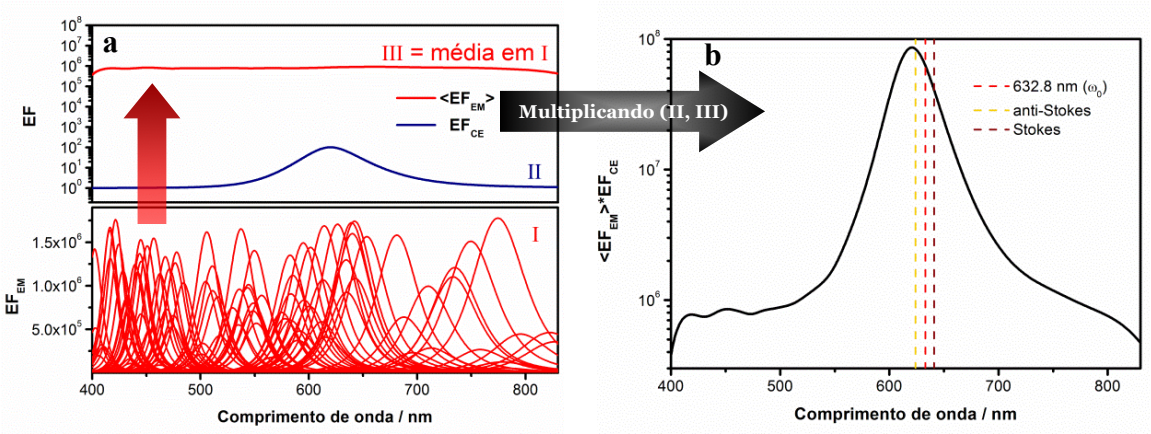


Figura 33: a) Modelo para as ressonâncias no perfil de intensificação SERRS com o comprimento de onda da radiação excitante no sistema metal-molécula, considerando um eletrodo ativado (ou outro substrato com alto grau de desordem). Na parte I são apresentados os fatores de intensificação eletromagnéticos EF_{EM}, em II o perfil do fator de químico CE e em III a média das ressonâncias em I. b) Fator de intensificação total no SERRS médio para o sistema em (a). As linhas tracejadas indicam as posições da radiação excitante e espalhada para o Stokes e anti-Stokes para um modo com frequência vibracional em 215 cm^{-1}.

Na Figura 33a são apresentadas, de forma esquemática, os perfis dos fatores de intensificação SERRS que uma molécula pode experimentar na superfície do eletrodo ativado. Em I (parte inferior da figura) são apresentados em vermelho os fatores de intensificação eletromagnética (EF_{EM}), os quais, devido a falta de organização do substrato, podem apresentar uma variedade de distintas ressonâncias em termos de posição e largura, como representado na figura. Na região II, em azul, é representado um perfil hipotético de intensificação devido ao mecanismo químico (EF_{CE}) que está relacionado à presença de transições eletrônicas permitidas envolvendo estados eletrônicos moleculares e do metal (Raman ressonante + transferência de carga). Espera-se o mesmo tipo de interação entre molécula e metal, independentemente da posição onde aquela esteja adsorvida e, portanto, não se espera grandes desvios desta última contribuição ressonante como no caso I da figura e, por este motivo, apenas uma ressonância é apresentada na região II. Em III apresentamos a média das ressonâncias em I, a qual caracteriza o comportamento SERRS médio do ponto de vista eletromagnético. Dependendo do número, variedade e propriedade dos "*hot spots*" que contribuem para o SERRS médio, esta média pode ser bastante larga, como representado na

figura. Nestas condições o fator de intensificação total (EF_{EM} x EF_{CE}) será dominado pela contribuição CE, como indicado na Figura 33b.

Neste ponto sugerimos que a contribuição ressonante para os resultados de SERRS médio são dominados pela contribuição CE, enquanto que no SERRS em regime de uma molécula apresentam também a contribuição das ressonâncias plasmônicas, permitindo a grande variedade de valores de ρ observados, cada um devido a uma condição específica de ressonância. Portanto, segundo esta interpretação, os resultados de SERRS médio sugerem a possibilidade de estimar a ressonância CE, enquanto que o SERRS de uma molécula possibilita estimar as energias de ressonância dos "*hot spots*".

Condição SERRS de uma molécula no experimento "Bi-analyte":

Para analisar os resultados do experimento SERRS em regime de uma molécula no experimento com dois analitos, efetuamos a análise de componentes principais para identificação e separação dos espectros de CV, BG, CV+BG e de apenas ruído. As duas primeiras componentes principais são apresentadas na Figura 34a, onde se observa que estas componentes principais não podem ser diretamente identificadas com os espectros de CV ou BG, mas a uma soma CV+BG, ou seja, o PCA neste caso não é capaz de separar completamente as características espectrais destes corantes, o que se deve à grande semelhança entre seus espectros SERRS (Figura 22 e Figura 30). Por este motivo, o MPCA foi utilizado para se tentar resolver este problema e as primeiras componentes principais obtidas por este método (MPC1 e MPC2) são apresentadas na Figura 34b, as quais apresentam grande correlação com os espectros SERRS médio na região Stokes destes corantes (figura anexada).

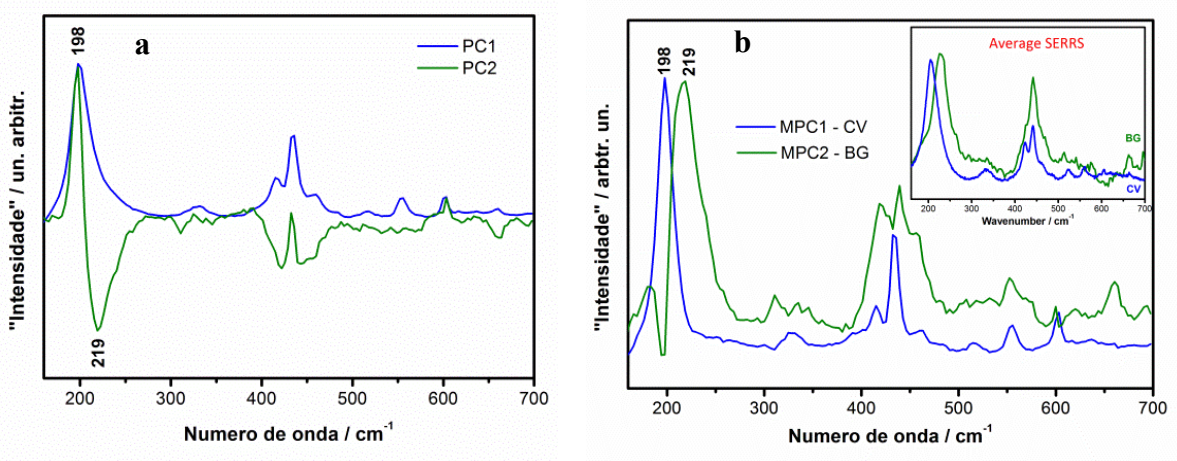


Figura 34: a) Componentes principais PC1 e PC2 em função do número de onda correspondente a região Stokes em que os espectros foram obtidos. b) Componentes MPC1 e MPC2 obtidas a partir dos dados em (a).

A análise MPCA permitiu, então, a separação e identificação dos espectros de cada corante no mapeamento através da contribuição relativa de cada componente MPCA em cada espectro SERRS, ou seja, cada um dos 2500 espectros foi decomposto nestas duas componentes principais e foi analisada a predominância de uma ou outra componente para descrição do espectro. Este procedimento permitiu a geração de um histograma com as contribuições de cada um dos corantes nos espectros obtidos, como apresentado na Figura 35, onde cada coluna do histograma descreve o número de espectros de apenas BG ou CV e de espectros em que ambos ou nenhum destes corantes são observados. Exemplos de eventos de cada coluna do histograma também são apresentados na Figura 35.

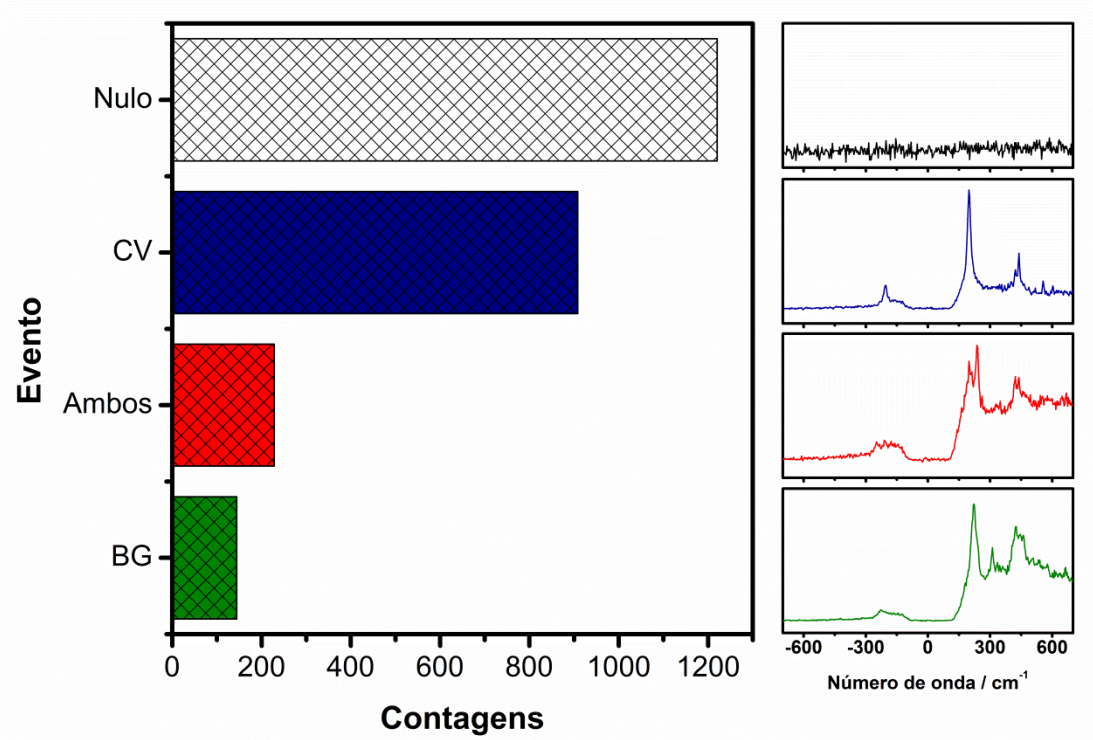


Figura 35: Histograma de distribuição dos eventos de observação de espectros de uma molécula (BG ou CV), de eventos em que as duas moléculas são observadas simultaneamente e de eventos em que nenhum espectro foi observado. Para cada coluna dos eventos é apresentado um espectro característico observado.

É interessante notar a maior distribuição de eventos de espectros de CV relativamente aos eventos de espectros da molécula BG. Este resultado se deve, provavelmente, à diferenças nas interações entre cada uma dessas moléculas e a superfície metálica. Estas possíveis diferenças nas constantes de adsorção permitirão observar uma quantidade maior de espectros de moléculas com a maior afinidade pela superfície metálica. [49, 79-80] Este resultado é muito semelhante ao caso da mistura R6G + CV analisado no Capítulo 2.

Após caracterização e extração das contribuições de cada molécula em todos os eventos, os valores de ρ foram calculados para as bandas em ~200 e ~220 cm^{-1} do CV e BG, respectivamente, os quais foram normalizados pelo valor médio das distribuições em regime de SERRS médio. Estes valores normalizados (κ) são apresentados na Figura 36.

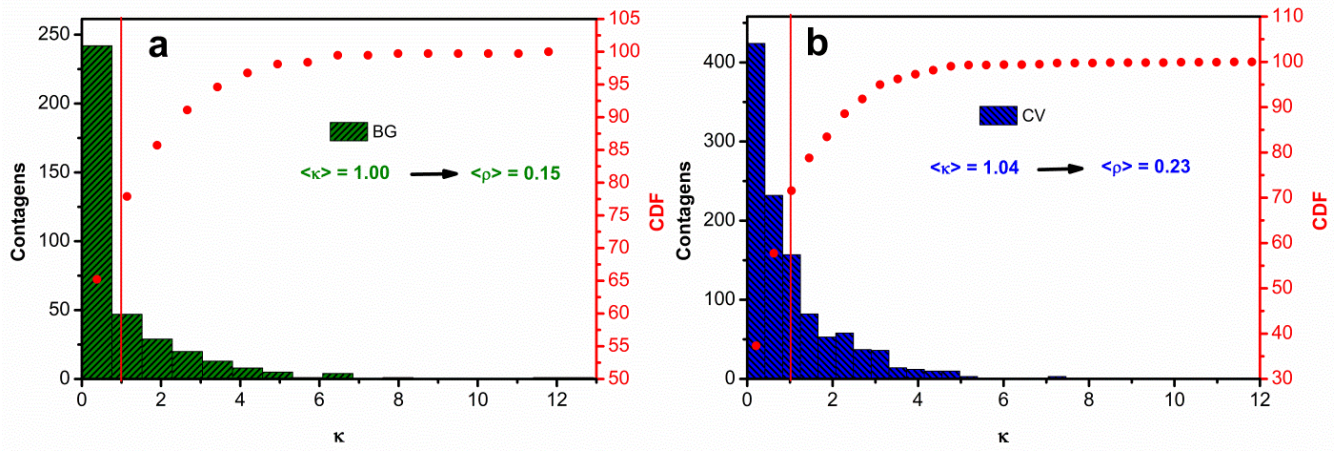


Figura 36: Histogramas de distribuição de κ para BG (a) e CV (b) na condição de uma molécula.

As distribuições de κ na Figura 36 apresentam um formato do tipo exponencial, semelhantes às distribuições observadas nos experimentos descritos no capítulo 2 no regime de uma molécula. Esta diferença com relação aos histogramas em condição de uma molécula de BG para diferentes potenciais aplicados (Figura 27 e Figura 28) é possivelmente devido à forma como a medida foi realizada (mapeamento ao invés de medida temporal). O mapeamento introduz uma maior variedade de "*hot spots*" para serem analisados, sendo que cada um destes pode ter características muito distintas quanto à intensificação dos lados anti-Stokes e Stokes, contribuindo, pois, para uma maior variedade dos valores de κ.

Apesar da diferença do número de eventos que compõem cada um dos histogramas da Figura 36, observa-se que os mesmos apresentam formatos muito semelhantes, o que pode ser notado pela equivalência do valor médio da distribuição (~1), pela porcentagem de eventos com $\kappa < 1$ e $\kappa > 1$ de *ca.* 70% e 30%, respectivamente, e pelos intervalos de possíveis valores de κ em ambos os casos. Quanto aos valores médios das distribuições próximos a 1 nos dois casos, isto mostra que os valor médio de ρ nestes experimentos é igual ao valor obtido no SERRS médio de cada corante, o que mostra, como esperado de acordo com a interpretação esquematizada na Figura 33, que no SERRS médio o sinal é originado por uma combinação linear das contribuições de todos os "*hot spots*" iluminados pelo laser durante a aquisição. No que diz respeito à maior porcentagem de eventos com $\kappa < 1$, esta informação se traduz em

uma maior distribuição de eventos com o lado Stokes intensificado. Além disso, os intervalos de valores que κ assume nos dois histogramas são semelhantes, o que indica que a normalização utilizada para gerar κ elimina contribuições referentes à estrutura eletrônica molecular. Neste caso, κ reflete a contribuição plasmônica para as relações anti-Stokes/Stokes o que está de acordo com o modelo da Figura 33, o que possibilita a determinação das energias de ressonâncias dos "*hot spots*" responsáveis pelos espectros observados de uma molécula. Este aspecto envolvendo κ constitui o objetivo do restante deste capítulo. Porém, antes de passar para esta tarefa queremos discutir um pouco sobre as características de alguns dos espectros contidos nos eventos em que bandas de ambas as moléculas (~198 e 220 cm^{-1} para o CV e BG, respectivamente) são observadas simultaneamente. Na Figura 37 são apresentados três destes espectros, selecionados para a seguinte discussão.

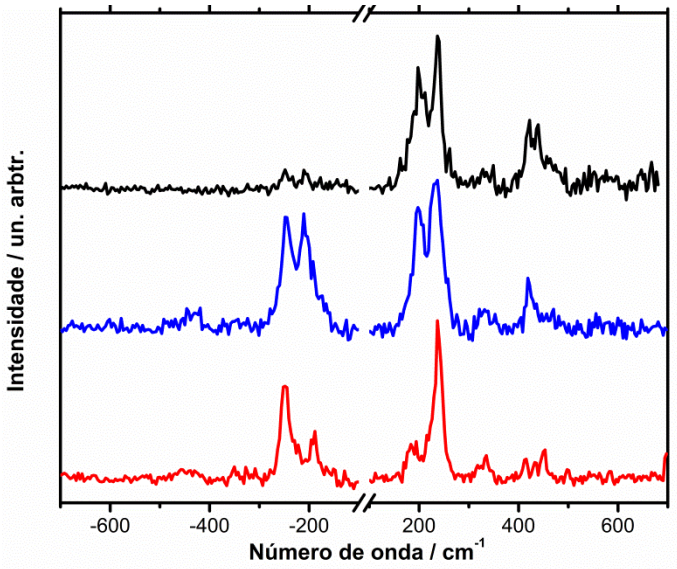


Figura 37: Espectros SERRS no regime de uma molécula selecionados da coluna "Ambos" da Figura 35, onde bandas das moléculas BG e CV são observadas simultaneamente. Os espectros foram tratados para remoção de fundo através do programa Cobra [81].

A Figura 37 tem por objetivo ilustrar uma característica de grande importância: os valores de κ não são sempre iguais para o BG e CV em um dado evento quando os espectros de ambos os corantes são observados simultaneamente. Por exemplo, os espectros em preto e azul na figura mostram eventos em que são obtidos valores muito próximos de κ para as duas moléculas, o que pode ser verificado pelas intensidades relativas das bandas em ~200 e 220

cm^{-1} nos lados anti-Stokes e Stokes. No espectro em preto o lado Stokes é mais intenso relativamente ao lado anti-Stokes para as duas moléculas do que o esperado segundo a distribuição térmica. No espectro em azul, por outro lado, o lado anti-Stokes é fortemente intensificado. O espectro em vermelho mostra uma situação em que se observam valores de κ bastante distintos para as duas moléculas. Para BG o sinal Stokes (~220 cm^{-1}) é mais intenso que o anti-Stokes. Por outro lado, para o CV a banda em 198 cm^{-1} mostra uma intensificação para o lado anti-Stokes relativamente ao Stokes se comparado ao esperado da distribuição térmica.

Quando duas moléculas ocupam um mesmo "*hot spot*" elas experimentam as mesmas condições de ressonância (CE e EM). Do ponto de vista da contribuição CE essa afirmação pode ser facilmente entendida em se considerando que este mecanismo de intensificação depende exclusivamente da interação química entre molécula e superfície, o que não deve ser diferente considerando-se moléculas adsorvidas em diferentes pontos da superfície. Do ponto de vista do mecanismo EM, o fator de intensificação eletromagnético (EF_{EM}), diferentemente do mecanismo químico, é dependente da posição da molécula no "*hot spot*". Este fato poderia levar à conclusão de que a posição da molécula em um mesmo "*hot spot*" poderia levar à observação de diferentes valores de κ. Porém, apesar da diferença entre os fatores de intensificação experimentados por moléculas em diferentes posições na superfície metálica, o perfil deste fator de intensificação com o comprimento de onda de excitação é o mesmo, como pode ser observado na Figura 38, que apresenta uma simulação efetuada através do método DDA (Aproximação de Dipolo Discreto) do perfil do fator de intensificação EF_{EM} para um modelo de "*hot spot*" constituído de duas esferas de Ag de 25 nm de raio no vácuo separadas por uma distância de *ca.* 1 nm. Detalhes do método DDA serão explorados no Capítulo 4 e, portanto, neste ponto nos manteremos à discussão do resultado da simulação.

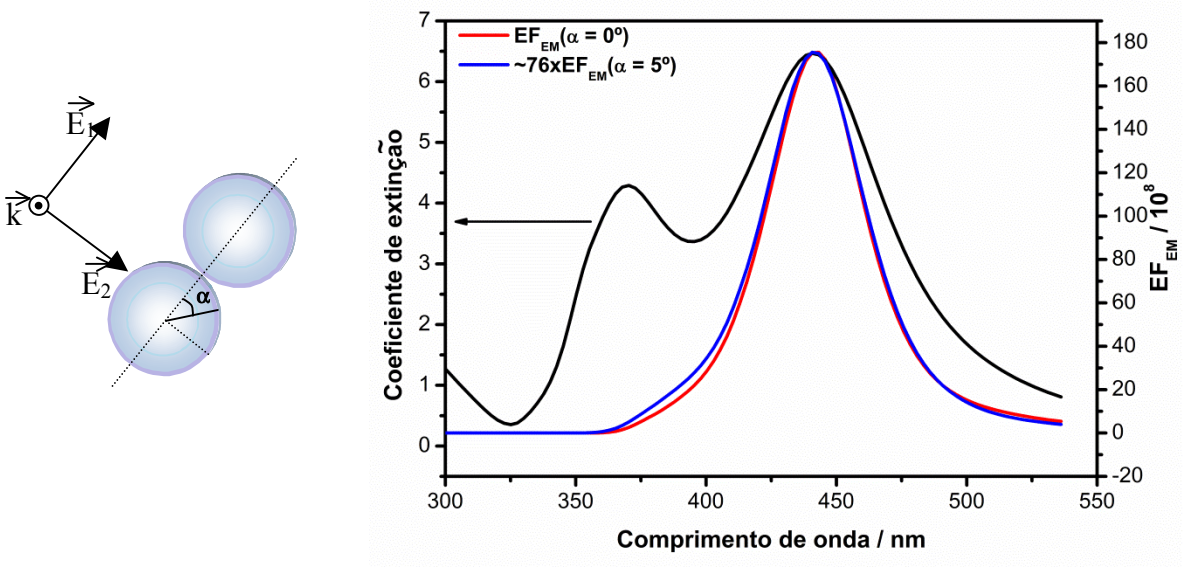


Figura 38: Simulação pelo método DDA ("*Discrete Dipole Approximation*") do espectro de extinção e do perfil do fator de intensificação EF_{EM} em um "*hot spot*" formado por nanopartículas de Ag de raio 25 nm separadas por uma distância de, aproximadamente, 1nm (como mostrado no detalhe da figura). As simulações foram realizadas para as duas polarizações do campo elétrico da radiação excitante. A direção de propagação é a mesma do vetor de onda (k), perpendicular ao plano do papel.

Na Figura 38 são apresentados espectro de extinção (linha preta) e o perfil do fator de intensificação EF_{EM} para duas posições na região entre as nanoesferas: $\alpha = 0^o$ e $\alpha = 5^o$, onde α corresponde ao ângulo em torno do eixo interpartículas como representado na figura. Estes perfis de intensificação são apresentados pelas linhas em vermelho ($\alpha = 0^o$) e azul ($\alpha = 5^o$). O perfil para $\alpha = 5^o$ foi multiplicado por um fator de ~76 vezes para igualar os valores máximos dos fatores de intensificação para as duas posições e, assim, se obter uma melhor comparação entre os dois perfis.

Nota-se na Figura 38 que o perfil de EF_{EM} para as duas posições são muito semelhantes, apresentando um formato do tipo Lorentziano com ressonância próximo a 450 nm. A única diferença entre as ressonâncias EM experimentadas pelas moléculas está na amplitude da mesma (fator de 76 vezes) e por uma contribuição para $\alpha = 5^o$ um da ressonância de plasmon das nanopartículas individuais (banda em ~370 nm). Porém, como os valores de κ descrevem relações de intensidade em dois comprimentos de onda distintos, os mesmos não dependem da amplitude da ressonância, mas da posição e formato da mesma e, portanto, duas moléculas em um mesmo "*hot spot*" devem apresentar o mesmo valor para κ como é o caso

dos espectros em preto e azul da Figura 37. Portanto, de acordo com o discutido até o momento, moléculas que se adsorvem no mesmo "*hot spot*" ou em "*hot spots*" com semelhantes ressonâncias devem apresentar os mesmos valores de κ, ao passo que moléculas que se adsorvem em "*hot spots*" com distintas ressonâncias eletromagnéticas devem levar à observação de valores diferentes para κ, como é o caso do espectro em vermelho na Figura 37. Estes resultados indicam que mesmos em espectros em que ambos os analitos são observados simultaneamente, existe a possibilidade de extrair informações de espectros de uma única molécula através das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes.

Para melhor ilustrar a característica de observação de espectros de uma molécula através das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes, foram calculados os valores de κ para as moléculas BG e CV (κ_{BG} e κ_{CV}) em cada um dos 2500 espectros. Um detalhe importante é que, sendo κ uma relação de intensidades, este precisa ser linearizado para tornar possível a observação não somente dos eventos com o lado anti-Stokes intensificado, mas também os eventos com o Stokes intensificado. Esta linearização foi realizada através da definição de $\kappa' = \kappa$ para descrever os eventos com o lado anti-Stokes intensificado ($\kappa > 1$) e $\kappa' = -1/\kappa$ para os eventos com o Stokes intensificado ($\kappa < 1$). O sinal negativo é apenas utilizado para não haver sobreposição dos eventos em uma apresentação gráfica. Esta definição de κ' permite uma comparação direta entre o seu valor e a interpretação de intensificação de um dos lados do espectro SERRS relativo ao regime de SERRS médio. Por exemplo, $\kappa' = 2$ significa que o evento apresenta um sinal anti-Stokes que é, relativamente ao Stokes, duas vezes o valor no SERRS médio e, ao contrário, $\kappa' = -2$ representa um sinal Stokes, relativamente ao anti-Stokes, que é o dobro do valor no SERRS médio.

Na Figura 39 são apresentados os valores experimentais de κ' para as moléculas BG e CV (κ'_{BG} e κ'_{CV}, respectivamente) para o conjunto de 2500 espectros. Na figura, os valores de $\kappa'_{CV} = 0$ e $\kappa'_{BG} = 0$ correspondem aos eventos em que são observados espectros somente de

BG e CV, respectivamente. Os demais valores de κ' são de espectros em que as duas moléculas são observadas simultaneamente, como na Figura 37. A linha vermelha corresponde a $\kappa'_{CV} = \kappa'_{BG}$ e foi adicionada para guiar a discussão. Todos os pontos que não são interceptados por esta linha correspondem a eventos em que as moléculas apresentam valores diferentes para κ'. A figura foi dividida em 4 quadrantes para designar diferentes situações $\kappa'_{BG} > 0$ e $\kappa'_{CV} > 0$ (quadrante I), $\kappa'_{BG} > 0$ e $\kappa'_{CV} < 0$ (quadrante II), $\kappa'_{BG} < 0$ e $\kappa'_{CV} < 0$ (quadrante III) e $\kappa'_{BG} < 0$ e $\kappa'_{CV} > 0$ (quadrante IV).

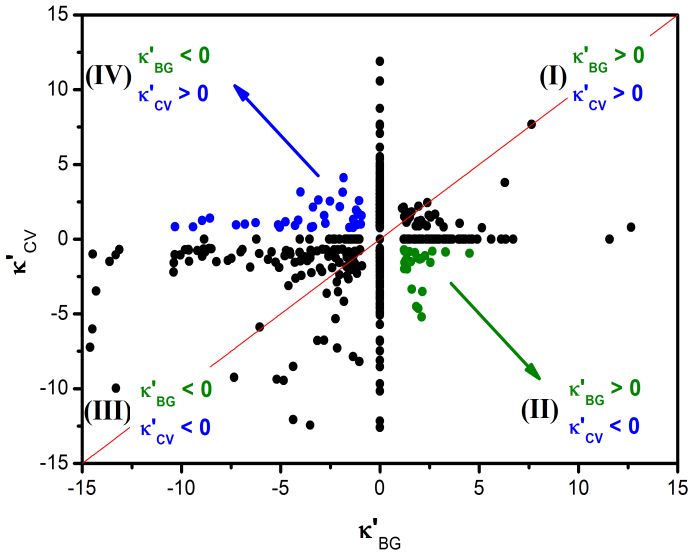


Figura 39: Valores de κ' = κ para os eventos com o lado anti-Stokes intensificado e κ' = -1/κ para eventos com o Stokes intensificado para as moléculas BG e CV. No quadrante (I) são apresentados eventos em que o lado anti-Stokes é intensificado para as duas moléculas. Em (II) são apresentados eventos em que o anti-Stokes é intensificado para o BG e o Stokes para o CV. No quadrante (III) os eventos são de Stokes preferencialmente intensificado para ambas as moléculas e em (IV) a molécula CV apresenta o lado anti-Stokes intensificado e o BG Stokes intensificado.

A Figura 39 mostra que quando as duas moléculas são observadas ao mesmo tempo em uma dada posição da superfície do eletrodo, κ' é diferente para as duas moléculas na maioria dos casos, o que implica que os sinais são originados de diferentes "*hot spots*" e, portanto, considerando a variedade de possíveis "*hot spots*" na superfície do eletrodo, estes resultados sugerem que um pequeno número de moléculas adsorvidas são "provadas" pela excitação Raman (SERRS), o que constitui em um possível diagnóstico para o regime de observação de uma molécula. Além disso, esta análise permite uma melhor identificação de eventos de uma molécula ocorrendo em diferentes "*hot spots*", o que usualmente é feito

através de medidas de correlação cruzada dos sinais SERS das moléculas utilizadas em um experimento "*bi-analyte*". Nestas medidas algum grau de correlação pode aparecer devido à emissão de fundo, por exemplo, o que poderia afetar a interpretação dos resultados. [82] Etchegoin e *col*. recentemente desenvolveram uma metodologia para identificação de eventos correspondentes a diferentes "*hot spots*" através da análise de imagens do CCD para um determinado evento.[47] Nossa proposta, porém, visa complementar, com menor custo experimental, tais medidas.

Modelo de ressonância

Nossa interpretação para as flutuações de intensidades nos lados anti-Stokes e Stokes é que as ressonâncias no sistema molécula-"*hot spot*" afetam os valores de σ_{AS} e σ_{S} devido às posições das radiações espalhadas em cada lado em relação à banda correspondente à condição de ressonância experimentada pela molécula adsorvida. A Figura 40 mostra essa ideia de maneira qualitativa com duas ressonâncias hipotéticas, uma no lado anti-Stokes e outra no lado Stokes.

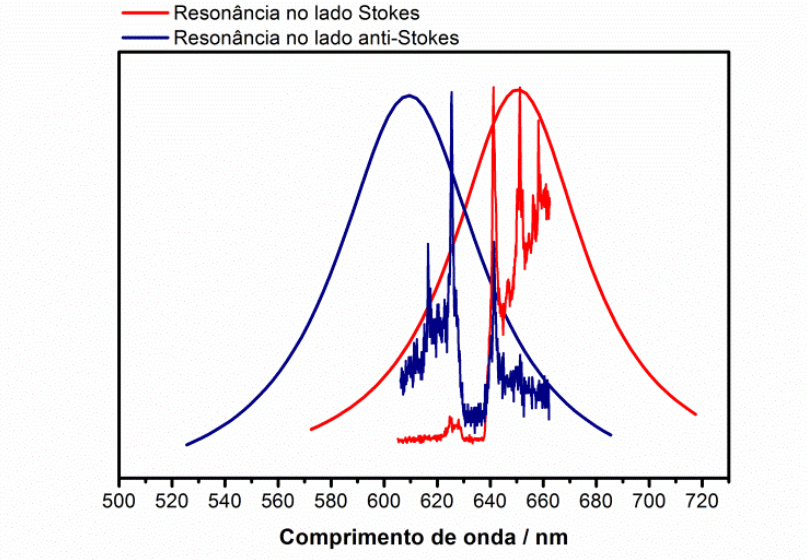


Figura 40: Modelo de ressonância para a intensificação dos lados anti-Stokes e Stokes. As curvas Lorentzianas em vermelho e azul descrevem ressonâncias para os lados Stokes e anti-Stokes, respectivamente. Os espectros SERRS apresentados (retirados do histograma da Figura 35) são para caracterizar as intensificações para cada lado do espectro SERRS devido a estas contribuições ressonantes.

Na Figura 40 são apresentados dois espectros SERRS de uma molécula retirados do histograma da Figura 35, dos quais podem ser observadas grandes diferenças quanto aos formatos dos espectros. No caso do espectro em vermelho, o lado Stokes (maior comprimento de onda em relação ao 632,8 nm) apresenta bandas com intensidades bastante superiores às intensidades para as bandas no lado anti-Stokes (menor comprimento de onda em relação ao 632,8 nm), o que mostra uma intensificação preferencial para o lado Stokes, que poderia ser interpretada como sendo o espectro SERRS originado de um sistema molécula-"*hot spot*" que apresente uma ressonância como à representada pela banda hipotética em vermelho na Figura 40. O espectro SERRS em azul, ao contrário, apresenta uma intensificação preferencial para o lado anti-Stokes, o que poderia estar associada à presença de uma ressonância como a apresentada em azul. Uma característica bastante importante dos espectros SERRS apresentados é o fundo, que acompanha a mesma tendência de intensificação que as bandas nos lados anti-Stokes ou Stokes, o que está de acordo com a interpretação de ressonância, como descrito por Itoh e *col*.[83-85].

Note que o termo ressonância é apresentado aqui de forma genérica, referindo-se à ressonância do perfil de intensificação SERRS com o comprimento de onda da radiação excitante, o qual apresenta, de forma geral, contribuição eletromagnética (EM) devido à ressonância entre a radiação excitante e modos de excitação de plasmon de superfície e química (CE) devido a ressonâncias entre a radiação excitante e transições internas da espécie molecular (efeito Raman ressonante, RR) e/ou ressonâncias com transições de transferência de carga (CT) envolvendo estados eletrônicos moleculares e o nível de Fermi no metal.

Lombardi e Birke, em uma descrição unificada para o efeito SERRS para a molécula CV adsorvida em nanopartículas de Ag, mostraram que estas três ressonâncias se sobrepõem na região em torno de 632,8 nm e, portanto, de maneira geral, as ressonâncias em azul e vermelho na Figura 40 podem ser vistas como uma combinação de cada um destes efeitos no

perfil do fator de intensificação SERRS. A extensão de cada contribuição para esta ressonância total depende da geometria das nanopartículas metálicas (do tipo de substrato SERS utilizado para obtenção dos espectros), da molécula-prova utilizada para as medidas SERRS e do tipo de interação entre esta molécula-prova e a superfície metálica. Como discutido na introdução desta tese, estas contribuições ressonantes podem ser incorporadas em uma expressão para a intensidade SERRS de um determinado modo vibracional através da Eq. 41 descrita por Lombardi e Birke.[26-27]

$$I_{SERRS}(\omega_0) \propto \left[\frac{1}{((2\varepsilon_0 + \varepsilon_1(\omega_0))^2 + \varepsilon_2(\omega_0)^2).((\omega_{FK} - \omega_0)^2 + \gamma_{FK}^2)((\omega_{IK} - \omega_0)^2 + \gamma_{IK}^2)} \right]^2$$

Eq. 41

onde o primeiro, segundo e terceiro termos do denominador são contribuições ressonantes para a intensidade SERRS de um determinado modo vibracional devido à excitação do plasmon de superfície, à transferência de carga entre metal e molécula e ao efeito Raman ressonante, respectivamente. Nesta equação, ω_0, ω_{FK}, ω_{IK}, são às frequências da radiação laser, da transição eletrônica de transferência de carga entre o metal e a molécula adsorvida e de uma transição eletrônica entre os níveis HOMO e LUMO da molécula, respectivamente. γ se refere ao fator de amortecimento de cada ressonância e está relacionado à largura de banda (quanto maior γ, mais larga a banda e menor o tempo de relaxação dos estados eletrônicos excitados). Para evitar confusões, o símbolo ω será utilizado para descrever uma frequência genérica, enquanto ω_0 será utilizado especificamente para o caso da radiação excitante. ε_0, ε_1 e ε_2 são a constante dielétrica do meio em que o metal está inserido (por exemplo H_2O, $\varepsilon_0 \approx 1{,}777$ [86]) e as partes real e imaginária da função dielétrica do metal, respectivamente.

Uma característica importante da Eq. 41 é a natureza multiplicativa de funções do tipo Lorentzianas, ou seja, de denominadores de ressonância. A expressão acima indica de forma qualitativa a contribuição de cada uma das ressonâncias discutidas, na qual não é discriminada

a contribuição da posição da radiação espalhada em relação à frequência de ressonância. Para levar em consideração esta contribuição, a intensidade SERRS pode ser descrita por

$$I_{SERRS}(\omega_0,\omega_s) \propto \omega_s^4 \frac{|E_{loc}(\omega_0)|^2}{|E_0|^2} \frac{|E_{loc}(\omega_s)|^2}{|E_0|^2} \sum_{\pi,\sigma} \alpha'^2_{\pi\sigma}(\omega,\omega_s)$$

Eq. 42

onde ω_s corresponde à frequência da radiação espalhada, ou seja, $\omega_s = \omega_0 \pm \omega_{vib}$, em que ω_{vib} descreve a frequência do modo vibracional. O sinal positivo está associado ao espalhamento anti-Stokes e o sinal negativo ao espalhamento Stokes. Os termos envolvidos na somatória correspondem aos elementos do tensor de polarizabilidade Raman na condição SERRS, ou seja, molécula adsorvida (fisica ou quimicamente) a uma superfície metálica e exposta a altas intensificações do campo local (E_{loc}) nas frequências das radiações incidente e espalhadas, descritas por termos da forma:

$$EF_{EM}(\omega_0,\omega_s) \approx \frac{|E_{loc}(\omega_0)|^2}{|E_0|^2} \frac{|E_{loc}(\omega_s)|^2}{|E_0|^2}$$

Eq. 43

A relação entre a Eq. 41 e a Eq. 42 pode ser obtida considerando que o primeiro termo da Eq. 41 se refere ao fator de intensificação eletromagnético (EF_{EM}) na superfície de uma esfera cujo diâmetro é muito menor que o comprimento de onda da radiação excitante. [4, 20-21] Os demais termos da Eq. 41 estão relacionados ao tensor de polarizabilidade Raman através da equação de dispersão de Kramers-Heisenberg-Dirac. Desta forma,

$$\frac{|E_{loc}(\omega)|^2}{|E_0|^2} \propto \left[\frac{1}{(2\varepsilon_0 + \varepsilon_1(\omega))^2 + \varepsilon_2(\omega)^2)}\right]^2$$

Eq. 44

De forma semelhante,

$$\sum_{\pi,\sigma}\alpha'^{2}_{\pi\sigma}(\omega_0,\omega_s) \propto \left[\frac{1}{((\omega_{FK}-\omega_0)^2+\gamma^2_{FK})((\omega_{IK}-\omega_0)^2+\gamma^2_{IK})}\right]^2$$

Eq. 45

Apesar de não haver uma dependência direta com a frequência da radiação excitante na Eq. 44, as componentes real e imaginária da função dielétrica ($\varepsilon_1(\omega)$ e $\varepsilon_2(\omega)$, respectivamente) apresentam forte dependência com a frequência da radiação excitante para o caso dos metais utilizados em SERRS, como Ag, Au e Cu. Portanto, se considerarmos o modelo de esfera adotado, a condição de ressonância ocorre quando $\varepsilon_1(\omega) = -2\varepsilon_0$, o que ocorre para uma específica frequência da radiação excitante, mostrando o caráter de denominador de ressonância para a contribuição eletromagnética.

No efeito Raman ressonante ou na contribuição de transferência de carga, podemos descrever os elementos do tensor de polarizabilidade Raman por uma única ressonância, ao invés de uma soma sobre estados. Desta forma, se considerarmos o caráter Lorentziano de uma ressonância [87], nós podemos modelar as ressonâncias acima através de funções Lorentzianas, ou seja:

$$\frac{|E_{loc}(\omega_0)|^2}{|E_0|^2}\frac{|E_{loc}(\omega_s)|^2}{|E_0|^2} \propto \left[\frac{1}{(\omega_{res,EM}-\omega_0)^2+\left(\frac{1}{2}\Gamma\right)^2}\right]^2 \cdot \left[\frac{1}{(\omega_{res,EM}-\omega_0 \mp \omega_{vib})^2+\left(\frac{1}{2}\Gamma\right)^2}\right]^2$$

Eq. 46

para a contribuição eletromagnética (EM) e

$$\sum_{\pi,\sigma}\alpha'^{2}_{\pi\sigma}(\omega,\omega_s) \propto \left[\frac{1}{(\omega_{res,CE}-\omega_0)^2+\left(\frac{1}{2}\Gamma\right)^2}\right] \cdot \left[\frac{1}{(\omega_{res,CE}-\omega_0 \mp \omega_{vib})^2+\left(\frac{1}{2}\Gamma\right)^2}\right]$$

Eq. 47

para a contribuição CE que reúne o efeito Raman ressonante e a transferência de carga, onde $\omega_{res,EM}$ e $\omega_{res,CE}$ correspondem às frequências das ressonâncias EM e CE, respectivamente. A Eq. 46 é uma descrição de EF_{EM} dentro da aproximação eletrostática e a Eq. 47 é adaptada do

formalismo Raman ressonante para os espalhamentos anti-Stokes e Stokes descrito por Schomacker e *col*.[88]

De acordo com o modelo de Lorentzianas as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes sob condições SERRS (ρ_{SERRS}) podem ser escritas através da combinação da Eq. 38, Eq. 46 e Eq. 47:

$$\rho_{SERRS} = \frac{(\omega_0 + \omega_{vib})^4}{(\omega_0 - \omega_{vib})^4} \frac{e^{-E_{vib}/k_B T}}{\left(1 + e^{-E_{vib}/k_B T}\right)} \cdot \left[\frac{(\omega_{res,CE} - \omega_0 + \omega_{vib})^2 + \left(\frac{1}{2}\Gamma_{CE}\right)^2}{(\omega_{res,CE} - \omega_0 - \omega_{vib})^2 + \left(\frac{1}{2}\Gamma_{CE}\right)^2}\right] \cdot \left[\frac{(\omega_{res,EM} - \omega_0 + \omega_{vib})^2 + \left(\frac{1}{2}\Gamma_{EM}\right)^2}{(\omega_{res,EM} - \omega_0 - \omega_{vib})^2 + \left(\frac{1}{2}\Gamma_{EM}\right)^2}\right]^2$$

Eq. 48

ou

$$\rho_{SERRS} = \rho_{térmico}\rho_{CE}\rho_{EM}$$

Eq. 49

onde

$$\rho_{térmico} = \frac{(\omega_0 + \omega_{vib})^4}{(\omega_0 - \omega_{vib})^4} \frac{e^{-E_{vib}/k_B T}}{\left(1 + e^{-E_{vib}/k_B T}\right)}$$

Eq. 50

$$\rho_{CE} = \left[\frac{(\omega_{res,CE} - \omega_0 + \omega_{vib})^2 + \left(\frac{1}{2}\Gamma_{CE}\right)^2}{(\omega_{res,CE} - \omega_0 - \omega_{vib})^2 + \left(\frac{1}{2}\Gamma_{CE}\right)^2}\right]$$

Eq. 51

$$\rho_{EM} = \left[\frac{(\omega_{res,EM} - \omega_0 + \omega_{vib})^2 + \left(\frac{1}{2}\Gamma_{EM}\right)^2}{(\omega_{res,EM} - \omega_0 - \omega_{vib})^2 + \left(\frac{1}{2}\Gamma_{EM}\right)^2}\right]^2$$

Eq. 52

De acordo com este modelo se a ressonância CE ou EM é muito larga comparativamente à diferença entre as energias da radiação incidente e espalhada, esta ressonância não apresenta contribuição para as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes ($\rho \approx$

1). Isto pode ser o caso, por exemplo, do SERRS médio no substrato ORC discutido anteriormente, em que a variedade de estruturas promove um caráter de uma ressonância larga para a contribuição EM. A Figura 41 mostra a dependência de ρ_{EM} (Eq. 52) em função da largura da ressonância, onde é possível notar que a contribuição eletromagnética pode se tornar desprezível em ρ para larguras acima de 6000 cm^{-1}. Na Figura 41 a ressonância foi ajustada para $\omega_{res,EM}$ = 16500 cm^{-1}.

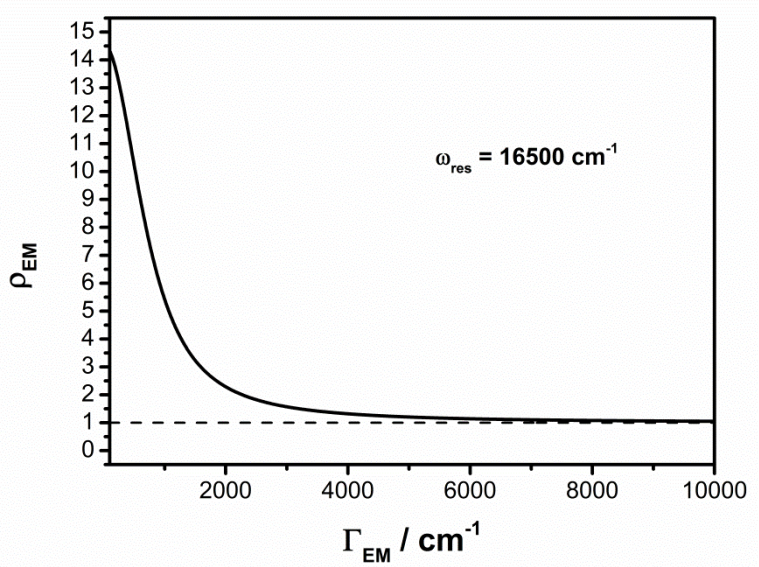


Figura 41: Dependência de ρ_{EM} em função da largura (Γ_{EM}) obtida por meio da Eq. 52, utilizando frequência de ressonância igual a 16500 cm^{-1}.

Dentro desta interpretação, no regime de SERRS médio ($\rho_{EM} \approx 1$), podemos escrever:

$$\rho_{SERRS} = \langle \rho_{SERRS} \rangle \approx \rho_{térmico} \rho_{CE}$$

Eq. 53

Lembrando que na ausência de respostas diferenciais do equipamento,

$$K = \frac{\rho_{SERRS}}{\rho_{ref}} = \frac{\rho_{SERRS}}{\rho_{térmico}}$$

então,

$$\langle K \rangle = \frac{\langle \rho_{SERRS} \rangle}{\rho_{térmico}} = \rho_{CE}$$

Eq. 54

onde $\langle K \rangle$ é o valor médio de K no SERRS médio, ou seja, de acordo com o discutido anteriormente, os resultados de ρ nos experimentos SERRS médio estão relacionados, dentro da proposta de interpretação, à contribuição CE.

Desta forma da Eq. 49 e Eq. 53,

$$\rho_{SERRS} \approx \langle \rho_{SERRS} \rangle \rho_{EM}$$

onde se escreve que o valor de ρ em um experimento SERRS, por exemplo no regime de uma molécula, depende do valor no experimento SERRS médio, multiplicado pela contribuição EM proveniente do "*hot spot*" investigado pela molécula. Podemos, então, escrever:

$$\kappa = \frac{\rho_{SERRS}}{\langle \rho_{SERRS} \rangle} \approx \rho_{EM}$$

Eq. 55

em que se lê que a normalização dos valores de ρ nas medidas de uma molécula pelo valor no SERRS médio elimina a contribuição intrínseca molecular tornando os valores normalizados (κ) relacionados aos "*hot spots*". Portanto, através dos valores de K e da Eq. 51, podemos estimar a energia da ressonância CE e através da Eq. 52 e utilizando os valores de κ podemos estimar as energias de ressonância dos "*hot spots*" responsáveis pela observação dos espectros que originaram o histograma da Figura 35. No primeiro caso, por exemplo, podemos investigar as energias das ressonâncias CE para o BG e CV utilizando os resultados de SERRS médio para as duas moléculas. Porém, a determinação exata das energias de ressonância através da Eq. 51 requer o conhecimento da largura de ressonância. Embora não seja possível acessar esta informação com o conjunto de dados experimentais coletados, podemos utilizar de argumentos razoáveis para estimar o par $(\omega_{res,CE}, \Gamma_{CE})$ que melhor reflete os valores de K para cada um dos corantes neste regime de altas concentrações. Por exemplo, para estimar as energias de ressonância CE referentes aos valores médios de ρ nas distribuições da Figura 31 nós analisamos os melhores pares $(\omega_{res,CE}, \Gamma_{CE})$ através da análise

do comportamento de K em função da energia de ressonância para diversos valores de Γ_{CE}, o que é apresentado na Figura 42 para radiação excitante em 632,8 nm (~15803 cm^{-1}).

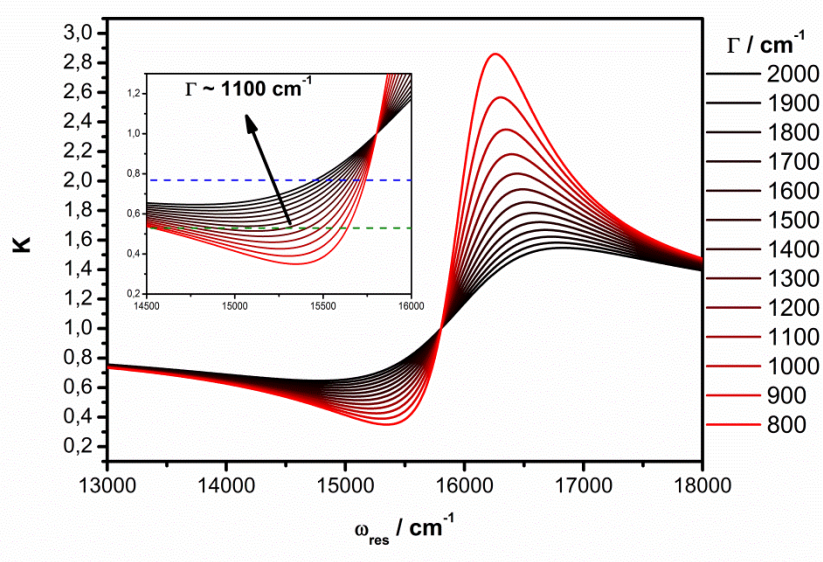


Figura 42: Simulação dos valores de K para diferentes frequências de ressonância e larguras de ressonância, como indicado.

Na Figura 42 as curvas de K_{CE} em função de $\omega_{res,EM}$ se sobrepõem quando $\omega_{res,EM}$ = 15803 cm^{-1} onde K_{CE} = 1, ou seja, não há intensificação preferencial para os lados anti-Stokes ou Stokes quando a energia de ressonância se iguala à da radiação excitante. Em outras palavras, não há diferença entre as secções de choque anti-Stokes e Stokes nestas condições. Quando a energia de ressonância não é igual a da radiação excitante, a Figura 42 mostra que K_{CE} é diferente de 1 e a extensão desta diferença é modulada pela largura Γ_{CE}.

No detalhe da Figura 42 são apresentados através de linhas tracejadas em azul e verde os valores experimentais de $\langle K_{SERRS} \rangle$ para o CV e o BG, obtidos a partir dos valores de $\langle \rho_{SERRS} \rangle$ da Figura 31 (SERRS médio). Os espectros UV-Vis dos corantes sugerem que as larguras das bandas de transição eletrônica HOMO → LUMO (que reflete o tempo de vida do estado excitado, LUMO) para estas moléculas são aproximadamente iguais, o que nos leva a aproximar que Γ_{CE} é aproximadamente igual para BG e CV. Com esta aproximação podemos verificar na Figura 42 a curva com menor valor de Γ_{CE} que intercepta os valores

experimentais. Na figura, esta curva é a para Γ_{CE} = 1100 cm^{-1}, que pode perfeitamente recriar os valores experimentais de $\langle K_{SERRS} \rangle$ para o BG e o CV para energias de ressonância aproximadamente iguais a 14700 e 15660 cm^{-1}. Note que no caso do BG este valor se refere à menor energia de ressonância (primeiro ponto no gráfico) que intercepta o valor experimental. Com estes pares $(\omega_{res,CE}, \Gamma_{CE})$ para cada molécula, podemos construir a curva de ressonância CE em potencial de circuito aberto que melhor descreve os resultados experimentais obtidos no SERRS médio. Estas curvas são apresentadas no detalhe da Figura 32, logo acima dos espectros UV-Vis dos corantes em solução. Estas curvas são, portanto, uma estimativa da contribuição CE (Raman ressonante + transferência de carga) das moléculas BG e CV adsorvidas em Ag.

Se este modelo tem validade para a finalidade de estimar as energias de ressonância, o mesmo deve ser capaz de reproduzir o formato da dependência de $\langle \rho_{SERRS} \rangle$ com o potencial aplicado (Figura 24), já que neste caso o potencial aplicado altera os valores de $\omega_{res,CE}$. Para verificar se este modelo é capaz de reproduzir o formato da Figura 24, os valores experimentais foram sobrepostos às curvas de K_{CE} em função $\omega_{res,EM}$ para alguns valores de Γ_{CE} (Figura 43). Os valores experimentais foram adicionados com os respectivos valores de desvio padrão como faixas horizontais na região que interceptam as curvas simuladas. As larguras das faixas correspondem aos valores de desvio padrão da distribuição K em cada potencial aplicado.

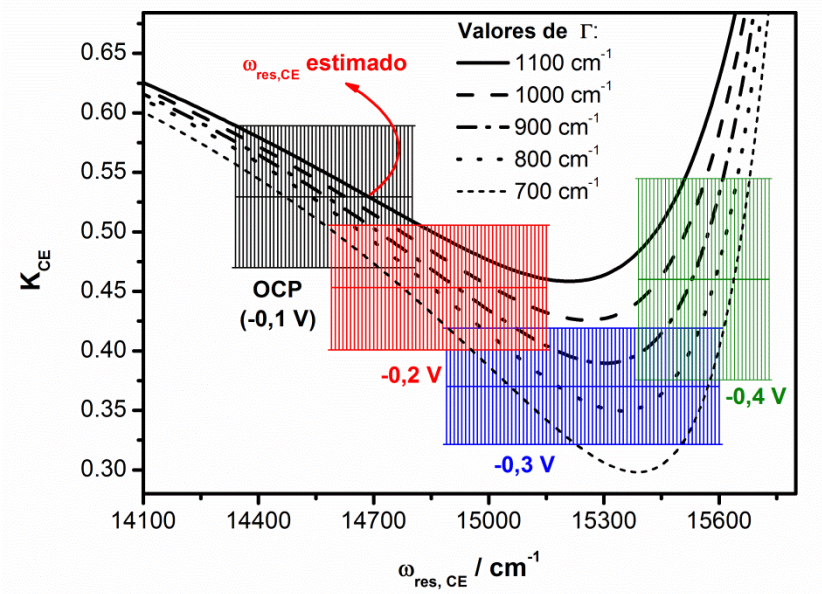


Figura 43: Comparação entre o perfil da dependência de K com o potencial aplicado no regime de SERRS médio com os perfis da dependência de K_{CE} simulado em função da frequência de ressonância $\omega_{res,CE}$.

Na Figura 43 notamos que as curvas simuladas são capazes de descrever o formato da dependência de $\langle K \rangle$ em função do potencial aplicado se as energias de ressonância mudam de ~14700 cm^{-1} (valor estimado da Figura 42) em potencial de circuito aberto para *ca*. 15600 cm^{-1} em potencial -0,4 V, ou seja, se o efeito do potencial aplicado é de aumentar a energia de ressonância, o que está de acordo com o modelo e interpretação propostos na Figura 26b, o que dá maior credibilidade e validade às estimativas das energias de ressonância através das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes. Com isto em mente, passamos agora a estimativa das energias de ressonância dos "*hot spots*" através dos valores de κ na condição de SERRS de uma molécula. Como κ não depende da estrutura eletrônica molecular, o procedimento adotado anteriormente (comparação entre os resultados do BG e CV) não pode ser aplicado. Para contornar este problema efetuamos simulação dos valores de κ com o uso da Eq. 55 e Eq. 52 para um intervalo de energias e largura de ressonância, cujos valores estão apresentados no mapa da Figura 44a. O procedimento adotado está esquematizado na Figura 44b, em que um dado valor experimental de κ é procurado no mapa de valores simulados de tal forma que, quando é encontrada uma equivalência entre os valores experimental e simulado, o par

$(\omega_{res,CE}, \Gamma_{CE})$ referente ao valor simulado é tido como uma possível solução para o nosso problema.

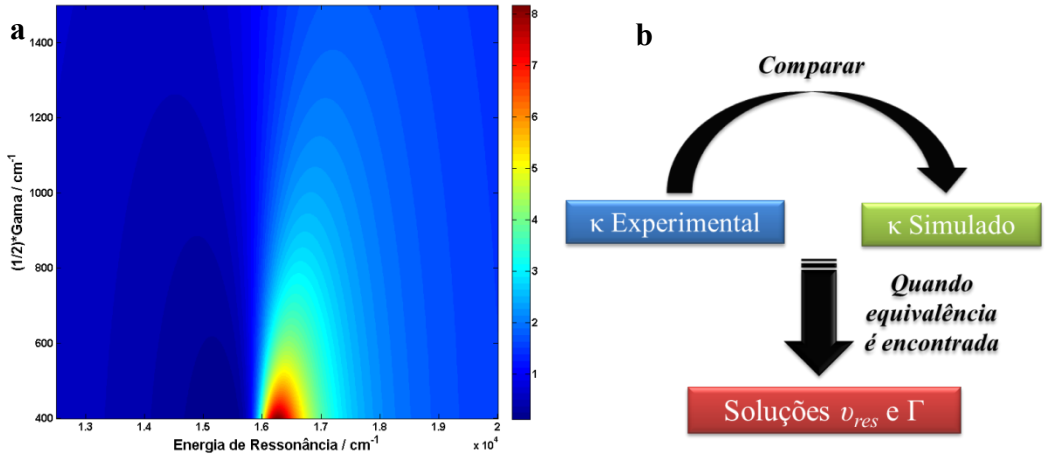


Figura 44: a) Dependência dos valores de κ com a energia de ressonância e largura de ressonância. b) Esquema para estimativa das energias de ressonância através da comparação entre os valores experimental e teórico.

O problema com o procedimento descrito acima é que existe uma distribuição de pares $(\omega_{res,CE}, \Gamma_{CE})$ para um mesmo valor de κ, como pode ser observado na Figura 44a e a dispersão de $(\omega_{res,CE}, \Gamma_{CE})$ pode ser elevada para um determinado intervalo de κ, principalmente para κ → 1. Porém, para alguns valores de κ esta distribuição de possíveis $(\omega_{res,CE}, \Gamma_{CE})$ pode ser estreita, possibilitando a estimativa da energia de ressonância para estes casos. Isto pode ser melhor observado na Figura 45.

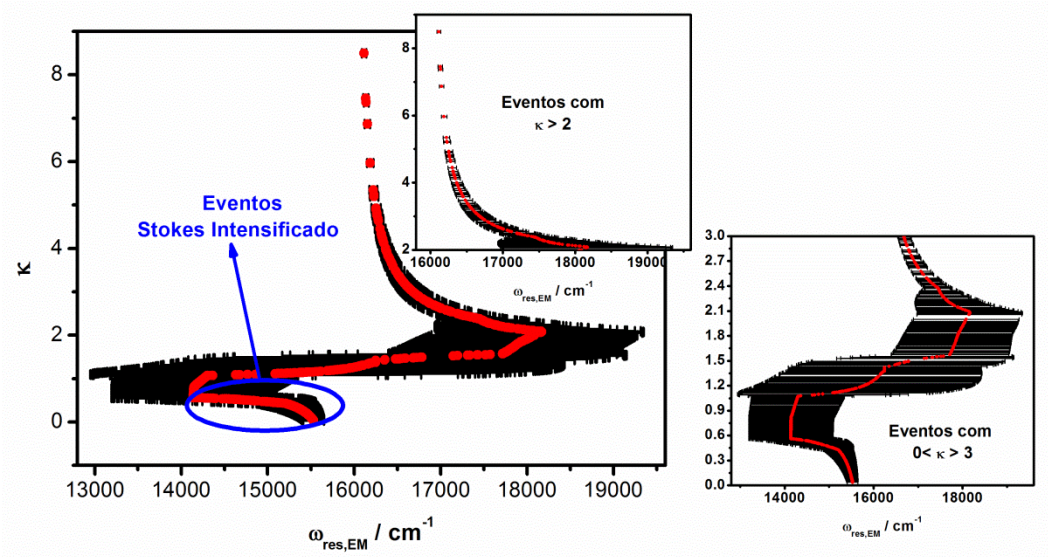


Figura 45: Frequências de ressonância ($\omega_{res,EM}$) para cada valor de κ.

Na Figura 45 apresentamos os possíveis valores de $\omega_{res,EM}$ para cada valor de κ experimental, obtidos através do método esquematizado na Figura 44b. Estes possíveis valores de $\omega_{res,EM}$ são representados pelas linhas horizontais. Os pontos em vermelho corresponde ao valor médio de $\omega_{res,EM}$. Analisando a figura, notamos que para $\kappa > 2$, a largura da barra horizontal é menor, ou seja, a distribuição de $\omega_{res,EM}$ em torno do valor médio é bem estreita e, portanto, nestes casos a energia de ressonância pode ser aproximada ao valor médio (pontos em vermelho). Note que $\kappa > 2$ se refere aos eventos com o lado anti-Stokes intensificado, o mesmo valeria para os eventos com o Stokes intensificado ($\kappa' < -2$, circulados em azul na figura). Para valores de κ próximos de 1, porém, a distribuição de $\omega_{res,EM}$ é bastante larga e nestes casos o valor médio não é uma boa estimativa para a energia de ressonância, ou seja, o procedimento não é valido nestes casos. Para $\kappa = 1$ podemos discriminar duas situações: 1) a ressonância é simétrica em torno da frequência de excitação laser, situação que não causa nenhuma intensificação preferencial das secções de choque anti-Stokes ou Stokes e 2) a energia de ressonância é muito diferente da energia de excitação (maior ou menor), ou seja, não causa efeitos significativos na intensificação de uma banda em 200 cm^{-1}. Neste último caso, pelo fato de que a ressonância estaria muito afastada da excitação laser e da energia da radiação espalhada, a intensificação SERRS seria muito baixa, tornando pouco provável a obtenção de fatores de intensificações suficientes para a observação de espectros de uma única molécula. Portanto, descartamos esta segunda situação e consideramos que os eventos com κ próximo a 1 são atribuídos a ressonâncias cujas frequências são próximas a da radiação excitante. Com este procedimento temos a possibilidade de estimar as energias de ressonância em cada "*ponto*" da área mapeada como apresentado na Figura 46a.

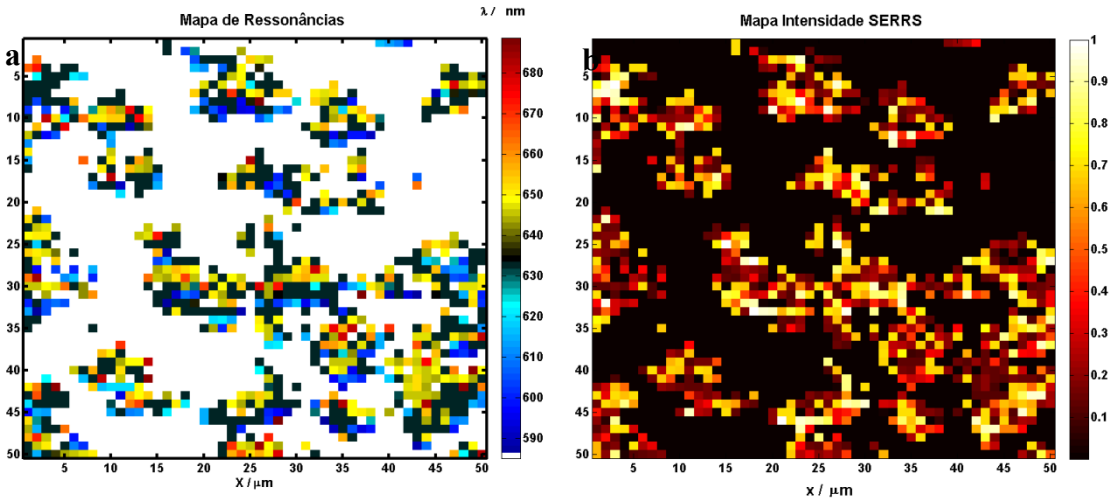


Figura 46: a) Ressonâncias determinadas na área mapeada do eletrodo ativado. b) Mapa das intensidades SERRS normalizadas para a banda ~200 cm^{-1} dos corantes na mesma área.

Na Figura 46a em cada ponto da área mapeada, referente a um determinado evento com característico valor de κ, é apresentado o valor de $\omega_{res,EM}$ (passado para comprimento de onda em nm para melhor visualização) determinado através da metodologia discutida acima. Lembrando que nos eventos em que duas moléculas foram observadas simultaneamente em um determinado "*ponto*" da área mapeada há possibilidade de obtenção de diferentes valores de κ, para construção do mapa da Figura 46a escolhemos o evento com maior intensidade SERRS para descrever estes pontos no mapa de ressonâncias. As regiões onde não foram observados espectros SERRS de nenhum dos corantes são apresentados na figura com a cor branca. Os eventos cuja energia de ressonância foi considerada igual ao da radiação excitante (15803 cm^{-1} ou 632,8 nm) foram demarcados com a cor preta.

Na Figura 46b é apresentado o mapa de intensidades SERRS (normalizado para mais fácil visualização). Nesta figura as regiões escuras são os pontos onde não foram observados espectros SERRS na área mapeada. Apresentamos esta figura para verificar se o método utilizado é válido ou não, principalmente na aproximação efetuada para os eventos com $\kappa \approx 1$. Para isto consideramos a aproximação no sentido inverso, ou seja, os eventos com energias de ressonância muito distantes da energia da radiação laser são, muito provavelmente, incapazes de permitir altas intensificações SERRS, ao contrário, as maiores intensidades

SERRS devem ser obtidas dos "*hot spots*" com ressonância igual à da radiação excitante. Desta forma, as regiões em preto na Figura 46a (632,8 nm) devem, na Figura 46b, corresponder às regiões com maiores intensidades SERRS, como de fato é observado. Ao contrário, as regiões com energias de ressonância um pouco mais distantes apresentam menor intensidade SERRS, como esperado. Isto mostra que o procedimento adotado permite estimar as energias de ressonância dos "*hot spots*" que estão de acordo com o esperado do ponto de vista teórico.

3.4 – Conclusões parciais

As flutuações das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes foram interpretadas à luz de um mecanismo de ressonância que permite intensificação preferencial das secções de choque anti-Stokes ou Stokes. Foi proposto um modelo de ressonâncias descrito por funções Lorentzianas tendo em vista os denominadores de ressonância na expressão da intensidade SERRS em função do comprimento de onda de excitação.

O modelo de ressonância permitiu, de forma eficaz, estimar as energias de ressonância dos perfis do fator de intensificação nos "*hot spots*", o que é de grande interesse para o campo de SERS em geral. Além disso, as interpretações possibilitaram identificar e separar a contribuição CE da EM para uma dada observação experimental, o que é, de forma geral, de grande dificuldade, mas de enorme interesse.

Outra característica importante foi que as análises permitiram novas interpretações sobre a natureza de espectros referentes a uma única molécula em experimentos "*bi-analyte*" em um substrato que contenha uma distribuição de "*hot spots*". As observações mostraram que, mesmo que bandas das duas moléculas utilizadas sejam observadas simultaneamente, a análise das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes pode permitir a identificação de eventos de uma molécula, originados em diferentes "*hot spots*" na área iluminada pela radiação laser.

Capítulo 4

Aplicação de simulações eletromagnéticas para "*hot spots*": Uma ferramenta para o estudo das propriedades SERS no regime de uma molécula

4.1 – Motivação

Na maioria dos experimentos SERS, principalmente no que se refere aos estudos de espectros de moléculas individuais, a maior contribuição para o sinal coletado é proveniente do mecanismo eletromagnético de intensificação do sinal Raman, devido acoplamento entre a radiação eletromagnética e modos de excitação de plasmon de superfície. Este acoplamento leva à intensificação local do campo elétrico sentido pela molécula prova, bem como do campo elétrico da radiação espalhada pela mesma (aproximação eletrostática [5, 20, 23, 25, 89]). Dessa forma, é natural que o tratamento teórico de um grande número das observações experimentais, principalmente no regime de uma molécula, seja realizado através de simulações eletromagnéticas, que se dispõem a resolver as equações de Maxwell sujeitas a condições de contorno.

Diversos métodos podem ser aplicados para tal finalidade, dentre os quais citamos a teoria de Mie e o método DDA. Ambos os métodos têm sua origem na resolução da equação de Helmholtz [90-91],

$$\left(\nabla^2 + k^2\right)\mathrm{E}(\vec{r}) = 0$$

Eq. 56

obtida através das equações de Maxwell, onde E se refere ao campo elétrico, mas pode ser considerado o campo magnético (B) em uma posição r = (x,y,z) no espaço e k corresponde ao vetor de onda no interior da nanopartícula ou no exterior da mesma (k_0).

A teoria de Mie, apesar de ser uma solução exata para as equações de Maxwell, se restringe a problemas (ou geometrias das nanopartículas) em que há a possibilidade de separação de variáveis, como por exemplo, esferas. Para esta geometria, as soluções (em termos de coordenadas esféricas r,θ,ϕ) obtidas para o campo elétrico e magnético no interior e no exterior da nanoesfera podem ser escritas através de expansões em série de vetores harmônicos esféricos ψ, do tipo

$$\psi(r,\theta,\phi) = R(r)\Theta(\theta)\Phi(\phi)$$

Eq. 57

A resolução deste problema de simetria esférica é semelhante à resolução da Equação de Schrödinger para o átomo de hidrogênio, mais familiar para nós químicos. Na realidade, a parte angular destas soluções (θ,ϕ) é idêntica nos dois problemas, os chamados harmônicos esféricos (polinômios de Legendre). A diferença entre o problema do átomo de hidrogênio e da nanoesfera na teoria de Mie está na parte radial (dependência com r), onde no primeiro caso são utilizados os polinômios de Laguerre e nas nanoesferas utiliza-se as funções de Bessel, Neumann e Hanckel. [90] O leitor mais interessado pode encontrar mais detalhes destas funções na referência [90] e no apêndice H da referência [5]. Dentro deste contexto, podemos escrever para o campo elétrico incidente ($\vec{E}^{inc}(k_0\vec{r})$), no interior da nanopartícula ($\vec{E}^{\text{int}}(k_0\vec{r})$) e espalhado ($\vec{E}^{esp}(k_0\vec{r})$)

$$\vec{E}^{inc}(k_0\vec{r}) = E_0\sum_{n=0}^{N_{cut}}\sum_{m=-n}^{n}\left[a_{n,m,M}^{(N_{cut})}M_{n,m}^{(1)}(k_0\vec{r}) + a_{n,m,N}^{(N_{cut})}N_{n,m}^{(1)}(k_0\vec{r})\right]$$

Eq. 58

$$\vec{E}^{\text{int}}(k\vec{r}) = E_0\sum_{n=0}^{N}\sum_{m=-n}^{n}\left[c_{n,m,M}^{(N_{cut})}M_{n,m}^{(1)}(k\vec{r}) + c_{n,m,N}^{(N_{cut})}N_{n,m}^{(1)}(k\vec{r})\right]$$

Eq. 59

$$\vec{E}^{esp}(k_0\vec{r}) = E_0\sum_{n=0}^{N}\sum_{m=-n}^{n}\left[p_{n,m,M}^{(N_{cut})}M_{n,m}^{(3)}(k_0\vec{r}) + p_{n,m,N}^{(N_{cut})}N_{n,m}^{(3)}(k_0\vec{r})\right]$$

Eq. 60

Nas equações acima, E_0 é a amplitude do campo elétrico da radiação incidente e $M_{n,m}^{(j)}$ e $N_{n,m}^{(j)}$ são funções obtidas através de ψ

$$M_{n,m}^{(j)} = \nabla \times (\vec{r}\,\psi_{n,m}^{(j)}) \quad \text{e} \quad N_{n,m}^{(j)} = \frac{1}{k}\nabla \times M_{n,m}^{(j)}$$

Eq. 61

e o sobrescrito j se refere ao tipo de função radial utilizada, Bessel (j = 1), Neumann (j = 2) e Hanckel (j = 3) e a escolha destas funções está relacionada ao seu comportamento assintótico: A função de Bessel descreve bem uma onda plana, enquanto que a função de Hanckel descreve uma radiação função esférica para $r \to \infty$ como esperado para o espalhamento de luz e, portanto, descreve o campo elétrico da radiação espalhada. [5]

$M_{n,m}^{(j)}$ e $N_{n,m}^{(j)}$ podem ser interpretados como os campos elétrico e magnético gerados por multipolos (dipolo, quadrupolo, hexapolo, octapolo, etc) descritos por n (1, 2, 3, 4, etc). $a_{n,m,M}^{(N_{cut})}$, $a_{n,m,N}^{(N_{cut})}$, $c_{n,m,M}^{(N_{cut})}$, $c_{n,m,N}^{(N_{cut})}$, $p_{n,m,M}^{(N_{cut})}$ e $p_{n,m,N}^{(N_{cut})}$ são coeficientes da expansão em série e estão relacionados às propriedades ópticas (índice de refração, por exemplo) do meio considerado (nanoesfera ou meio em que a mesma está inserida), as quais devem ser fornecidas através do uso de tabelas de dados experimentais. Os coeficientes $c_{n,m,M;N}^{(N)}$ e $p_{n,m,M;N}^{(N)}$ podem ser descritos em função dos coeficientes $a_{n,m,M;N}^{(N)}$ para a radiação incidente. Portanto, uma vez que as propriedades ópticas dos meios materiais são fornecidas, a solução do problema pode ser, então, obtida através do cálculo dos coeficientes da expansão em série em função destas propriedades até a ordem do multipolo que leva a uma convergência (até N_{cut}) na Eq. 58, Eq. 59 e Eq. 60, acima.

O espectro de extinção pode ser calculado através da secção de choque de extinção (σ_{ext}), o qual pode ser comparado com os espectros UV-Vis obtidos experimentalmente para as nanopartículas esféricas consideradas (solução coloidal). Na teoria de Mie σ_{ext} pode ser calculado através de:

$$\sigma_{ext} = \frac{-1}{k^2} \sum_{n,m} \left[\mathrm{Re}\left(a^{(N)}_{n,m,M} p^{(N)*}_{n,m,M} \right) + \mathrm{Re}\left(a^{(N)}_{n,m,N} p^{(N)*}_{n,m,N} \right) \right]$$

Eq. 62

Ao contrário da teoria de Mie, o método DDA permite a simulação de nanopartículas de diversas geometrias, incluído arranjos de nanopartículas, através da divisão de cada nanopartícula em um número finito de objetos cúbicos polarizáveis, em que o momento de dipolo induzido (P) em cada um destes objetos (ou elementos) é dado por:

$$\vec{P}_j = \alpha_j \cdot \vec{E}_{loc}\left(r_j \right)$$

Eq. 63

Na Eq. 63 $\vec{E}_{loc}\left(r_j \right)$ é o campo elétrico local sentido pelos objetos j na posição r_j que constituem a nanoestrutura. Este campo elétrico apresenta componente proveniente da radiação laser incidente (onda plana) e componente proveniente dos dipolos induzidos em cada um dos demais objetos utilizados para construir a geometria da nanoestrutura. O termo α_j constitui o tensor de polarizabilidade do objeto. No caso de metais, como Ag, Au e Cu, importantes para o efeito SERS, este tensor é isotrópico e pode ser descrito pelo uso da polarizabilidade obtida por meio da relação de Clausius-Mossotti [92]:

$$\alpha_j^{CM} = \frac{3d^3}{4\pi} \frac{\varepsilon_j - 1}{\varepsilon_j + 2}$$

Eq. 64

onde d corresponde às distancias entre os dipolos e ε_j a função dielétrica do metal. No método DDA esta descrição para a polarizabilidade apresenta um termo de correção para levar em consideração de que não estamos descrevendo a nanopartícula como um meio contínuo, mas através de um retículo cúbico com um número finito de dipolos. [92]

A boa descrição das propriedades ópticas das nanoestruturas através do método DDA depende, entre outros aspectos operacionais, da qualidade na descrição da função dielétrica do metal. Apesar de existir formulações analíticas para estas funções dielétricas para Ag e Au [5, 20, 93], nesta tese foram utilizadas principalmente as compilações de valores experimentais

para estas funções para Ag e Au descritas por Palik [18], bem como suas correções para incluir o meio dielétrico em que as estruturas foram simuladas.

O campo elétrico local em uma determinada posição r_i é obtido através de:

$$\vec{E}_{loc}(r_i) = \vec{E}_0 \exp(i\vec{k} \cdot \vec{r}_i) - \sum_{j \neq i} A_{ij} \cdot \vec{P}_j$$

Eq. 65

onde o primeiro termo descreve o campo elétrico da radiação incidente com amplitude máxima E_0, propagando na direção do vetor de onda $\vec{k}$. O termo na somatória é dado por:

$$A_{ij} \cdot \vec{P}_j = \frac{\exp(ikr_{ij})}{r_{ij}^3} \times \left\{ k^2 \vec{r}_{ij} \times \left(\vec{r}_{ij} \times \vec{P}_j \right) + \frac{\left(1 - ik\vec{r}_{ij}\right)}{r_{ij}^2} \left[r_{ij}^2 \vec{P}_j - 3\vec{r}_{ij} \left(\vec{r}_{ij} \cdot \vec{P}_j \right) \right] \right\}$$

Eq. 66

e descreve uma onda esférica espalhada (dependência fora do colchetes) devido à cada um dos dipolos P_j que compõem a nanoestrutura. A equação a ser resolvida (Eq. 66) é um sistema de equações lineares, cuja resolução é feita de modo auto-consistente. [91, 94-96] Inúmeros métodos podem ser aplicados para a resolução deste sistema de equações e nosso grupo tem utilizado o programa desenvolvido por Draine e *col*. conhecido como DDSCAT.[94,97] que possibilita a escolha do tipo de algorítmo a ser utilizado, como por exemplo, método do gradiente biconjugado [98], que permite obter resultados bastante satisfatórios com custos computacionais relativamente baixos, o qual foi utilizado em todas as simulações DDA nesta tese [99].

No método DDA as secções de choque de extinção, de absorção (σ_{abs}) e de espalhamento (σ_{esp}) podem ser calculadas para cada comprimento de onda através da Eq. 67, Eq. 68 e Eq. 69, respectivamente, e os espectros de extinção obtidos podem ser comparados com os espectros UV-Vis observados experimentalmente.

$$\sigma_{ext} = \frac{4\pi k}{|\vec{E}_0|^2} \sum_{j=1}^{N} \mathrm{Im}(\vec{E}_{0,j}^{*} \cdot \vec{P}_j)$$

Eq. 67

$$\sigma_{abs} = \frac{4\pi k}{|E_0|^2} \sum_{j=1}^{N} \left\{ \mathrm{Im}\left[\vec{P}_j \left(\alpha_j^{-1} \right)^* \vec{P}_j^{\,*} \right] - \frac{2}{3} k^3 \left| \vec{P}_j \right|^2 \right\}$$

Eq. 68

e

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{esp}$$

Eq. 69

No capítulo anterior mostramos que as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes podem nos fornecer detalhes das ressonâncias nos "*hot spots*". Estas ressonâncias experimentadas pelas moléculas correspondem a ressonâncias no fator de intensificação EF_{EM}. Desta forma, as simulações eletromagnéticas descritas acima podem nos fornecer algumas informações para auxiliar na interpretação de alguns dos resultados obtidos no capítulo anterior, como por exemplo, o fato de que para o coloide de Ag sintetizado, as relações anti-Stokes/Stokes apresentam pequena flutuação em torno de um valor médio muito próximo ao esperado de acordo com o equilíbrio térmico.

4.2 – Experimental e computacional

Os coloides de Ag e Au foram preparados segundo o procedimento descrito por Lee e Meisel [65] e por Frens [100].

Os espectros SERRS de BG e CV apresentados neste capítulo se referem às mesmas condições experimentais utilizadas nos experimentos para o regime de detecção de uma molécula discutidos no capítulo anterior utilizando o coloide de Ag como substrato SERS. As imagens SEM do coloide de Ag foram obtidas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em um equipamento JSM – 7401 F – Field Emission Scanning Electron Microscope.

As simulações DDA foram realizadas através do programa DDSCAT 7.1 [92, 97] desenvolvido e disponibilizado por Draine e Flatau. Nestas simulações as nanopartículas foram consideradas imersas em água, o que é realizado através da correção do comprimento

de onda no meio (índice de refração da água ~1,333 [86] para radiação excitante na região do visível/infravermelho próximo). Foram utilizadas para Ag e Au as compilações de Palik e de Johnson e Christy, respectivamente. Esta última foi utilizada para o Au devido a melhor descrição da constante dielétrica (principalmente a parte imaginária) na região do azul e ultravioleta, de grande importância para a resposta óptica do Au. Foi utilizado o método do gradiente biconjugado em todas as simulações DDA para a resolução do sistema de equações lineares. Nestas simulações foram utilizados espaçamentos entre os dipolos de aproximadamente 0,5 nm.

As simulações pela teoria de Mie foram realizadas através do programa SPLaC [5] desenvolvido e disponibilizado por Le Ru e Etchegoin. Este programa consiste em um conjunto de códigos escritos em linguagem Matlab, dentre os quais se encontra um código para resolução para o problema de esfera de tamanho arbitrário. Apenas para comparação, nestas simulações para esferas de Au, as propriedades ópticas do metal foram descritas pelo uso da modelagem de Etchegoin e *col*. [93] para a função dielétrica do Au, também incluída no pacote disponibilizado. A importância desta modelagem está na grande contribuição de transições interbanda que contribuem para a parte imaginária da função dielétrica.

4.3 – Resultados e discussão

Neste capítulo iremos discutir dois resultados experimentais relacionados ao capítulo anterior desta tese, que motivaram as simulações a serem apresentadas a seguir. O primeiro diz respeito à distribuição das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes (ρ) em regime de uma molécula em coloide de Ag. O segundo está relacionado às larguras das ressonâncias eletromagnéticas no eletrodo ativado ORC discutidas na última parte do capítulo. Estas ressonâncias apresentaram larguras à meia altura com valores da ordem de 700 - 800 cm^{-1} ou inferiores, o que é bastante fino se compararmos com a ressonância de plasmon de uma

nanopartícula individual ou mesmo um "*hot spot*" formado por estas nanopartículas (este ponto será melhor discutido mais adiante).

4.3.1. - Sobre as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes em coloide de Ag.

Quanto ao primeiro resultado experimental, verificamos no histograma da Figura 29 do capítulo anterior, que a distribuição de ρ no coloide, se comparada às distribuições apresentadas para o eletrodo ativado, não apresentou valores muito elevados (altas intensificações para o lado anti-Stokes relativamente ao lado Stokes) ou muito pequenos (alta intensificação para o lado Stokes relativamente ao lado anti-Stokes), mas valores que se distribuem de forma muito parecida com uma distribuição normal em torno de um valor médio próximo ao esperado para um equilíbrio térmico na ausência de efeitos ressonantes afetando as secções de choque anti-Stokes e Stokes. Sabemos que neste sistema existem contribuições ressonantes experimentadas pela molécula, a dizer o efeito Raman ressonante, a contribuição de transferência de carga e as ressonâncias de plasmon de superfície. Porém para melhor entendermos os resultados obtidos, precisamos verificar como estão as ressonâncias em torno da excitação laser, principalmente as ressonâncias de plasmon de superfície. Como as interações entre as moléculas e o metal são as mesmas seja no eletrodo ativado ou no coloide, interpretamos a fonte para as diferenças observadas como sendo originadas pelas ressonâncias de plasmon de superfície no coloide.

Como nosso interesse para os valores de ρ está no comportamento das ressonâncias de plasmon de superfície em torno da radiação excitante, apresentamos espectros SERRS (excitação em 632,8 nm, Figura 47) e SERS (excitação em 785 nm, Figura 48) em regime de uma molécula para solução contendo BG e CV ("*bi-analyte*"). Para uma análise mais ampla dos espectros nas duas radiações, na Figura 47 e na Figura 48 são apresentadas sequências temporais de espectros obtidos na região anti-Stokes e Stokes para cada comprimento de onda da radiação laser.

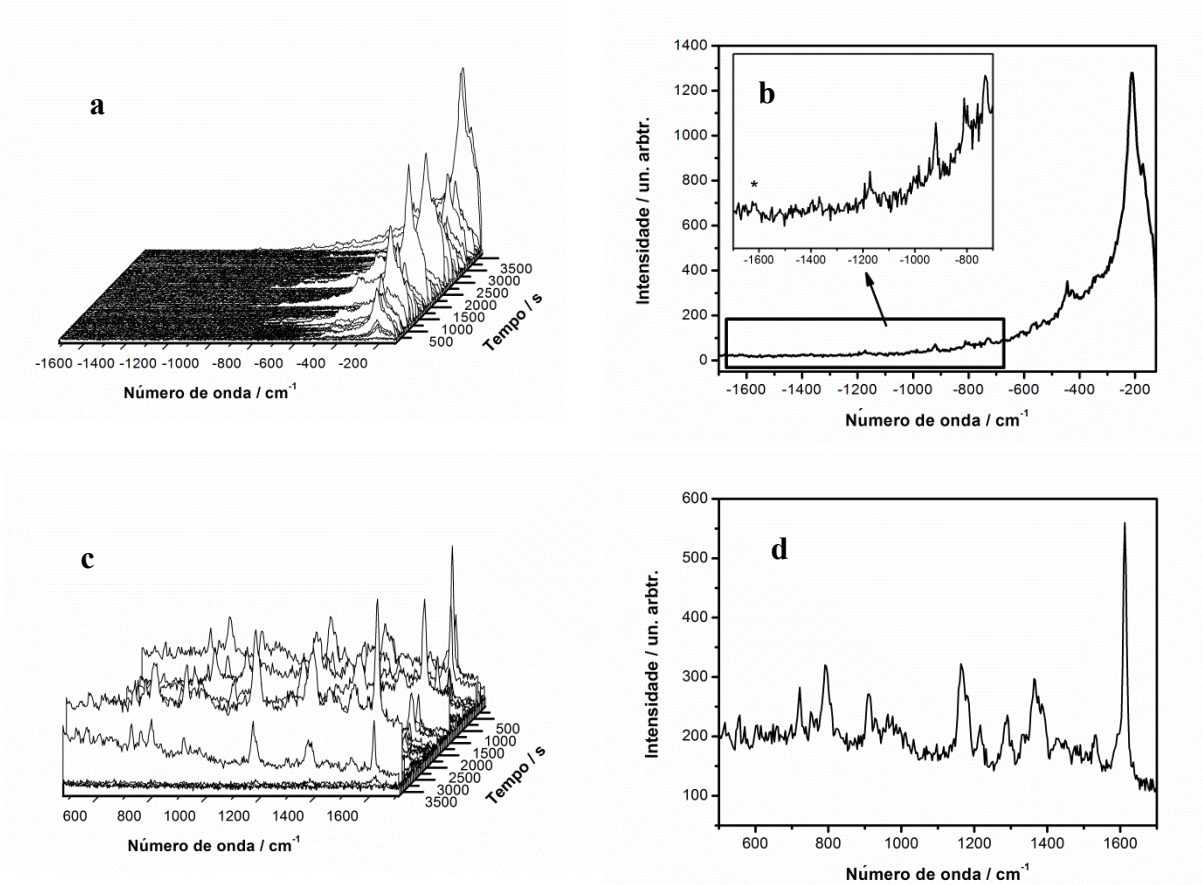


Figura 47: Sequências temporais de espectros obtidos com radiação excitante 632,8 nm na região anti-Stokes (a) e Stokes (c). Os espectros em (b) e (d) são os espectros mais intensos de (a) e (c).

Na Figura 47a e Figura 47c são apresentados os espectros obtidos para a região anti-Stokes e Stokes, respectivamente, e na Figura 47b e Figura 47d são apresentados alguns espectros representativos dos eventos de maior intensidade nas sequências temporais. Duas observações importantes podem ser feitas destes resultados: a maioria dos espectros tem a característica dos espectros da molécula CV, como esperado de acordo o apresentado no capítulo anterior e no lado anti-Stokes as bandas referentes a modos vibracionais de maior frequência apresentam intensidades muito baixas, mas onde ainda é possível visualizar algumas dessas bandas como, por exemplo, a banda em *ca*. -1200 cm^{-1}. O sinal da banda em *ca*. -1600 cm^{-1}, a banda mais intensa no lado Stokes, é perdida em meio ao ruído.

O fato de que as bandas de modos vibracionais de maior frequência são dificilmente observadas para radiação excitante em 632,8 nm não é nenhum resultado surpreendente levando-se em consideração de que o mecanismo VP ("*Vibrational Pumping*") não é tão

expressivo em nossos resultados e que à temperatura ambiente a probabilidade de haver moléculas em estados vibracionais excitados para modos de alta frequência é muito baixa, dado que esta probabilidade é proporcional a $e^{-E_{vib}/k_B T}$. Estamos desconsiderando aquecimentos locais nestes resultados, como no capítulo anterior, o que foi evidenciado também pela ausência de alterações significativas nos histogramas de ρ para as bandas em ~200 cm^{-1} com o aumento da potência da radiação laser (resultados não apresentados). Além disso, o aumento da potência não levou a um aumento significativo das intensidades das bandas na região de alta frequência.

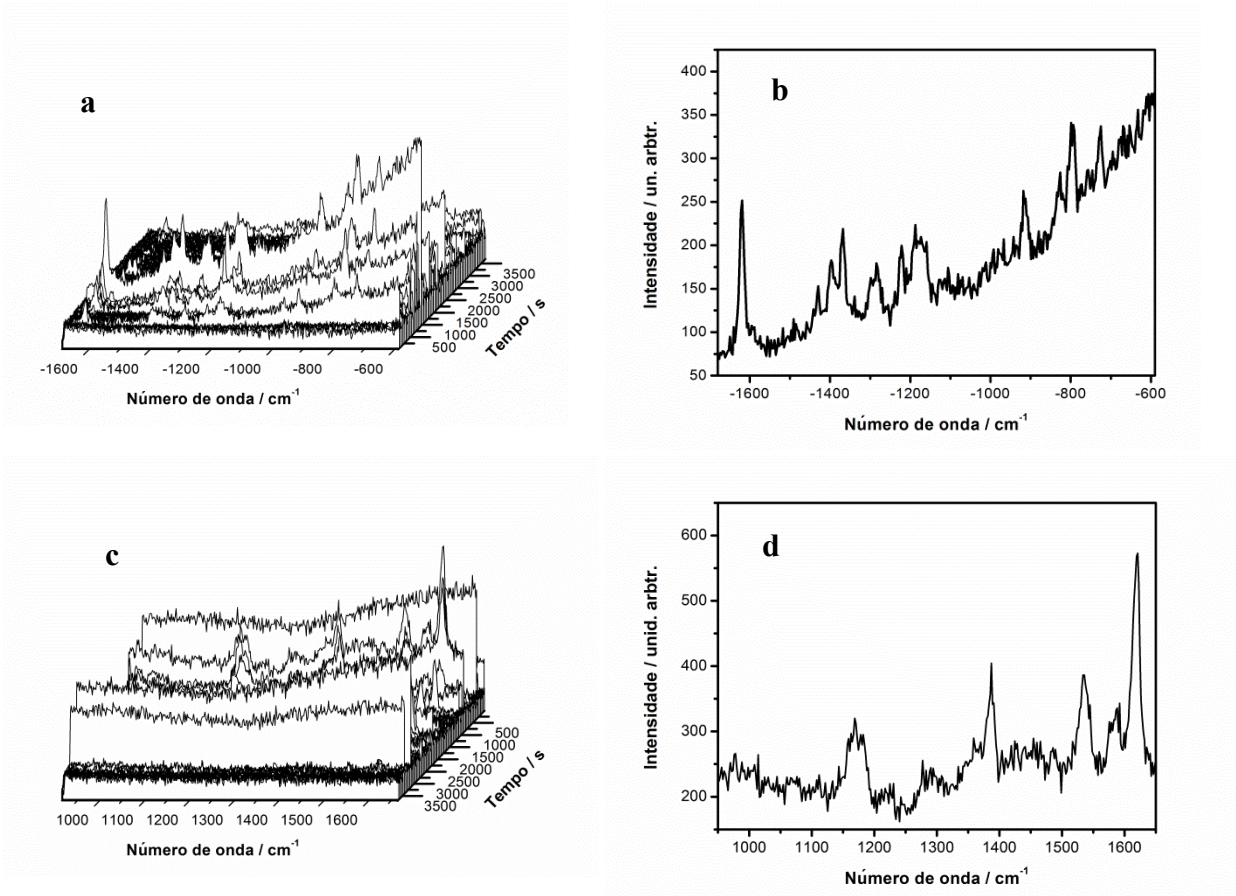


Figura 48: Sequências temporais de espectros obtidos com radiação excitante 785 nm na região anti-Stokes (a) e Stokes (c). Os espectros em (b) e (d) são os espectros mais intensos de (a) e (c).

No experimento com excitação em 785 nm, por outro lado, os resultados são diferentes dos obtidos para o 632,8 nm. Isto pode ser observado na Figura 48, na qual é possível visualizar, ao contrário das medidas em 632,8 nm, bandas na região de alta frequência no lado anti-Stokes com intensidades relativamente altas. Pode-se pensar que tal

observação seria resultado de diferenças entre as potências das radiações laser e/ou devido a respostas diferenciais do CCD. O primeiro argumento poderia ser utilizado como motivo, uma vez que medidas aproximadas indicaram que a potência da radiação em 785 nm é pelo menos uma ordem de grandeza maior que a radiação em 632,8 nm. Porém, o aumento da potência da radiação 632,8 nm em uma ordem de grandeza, não levou à observação de intensidades significativas para as bandas de alta frequência nesta radiação no lado anti-Stokes, como pode ser visualizado na Figura 49, onde é possível observar que o formato dos espectros é muito diferente do formato dos espectros na Figura 48c. Nestes espectros um sinal pouco intenso para a banda em -1600 cm^{-1} é observado em apenas 2 dos 3000 espectros na sequência temporal, situação muito diferente da Figura 48. Portanto, será descartada a hipótese da diferença entre as potências das radiações laser utilizadas.

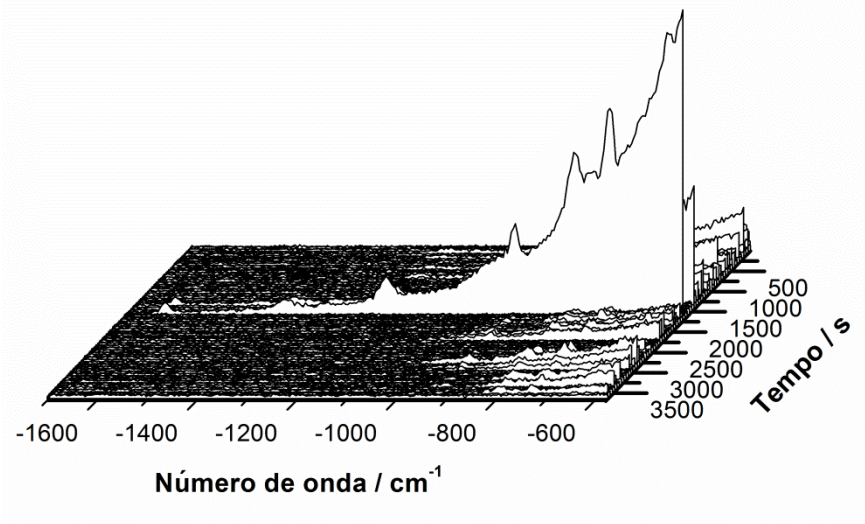


Figura 49: Sequência temporal de espectros obtidos com radiação excitante 632,8 nm na região anti-Stokes.

Outro motivo que poderia ser utilizado para os resultados observados nas radiações 632,8 nm e 785 nm é a possibilidade de respostas diferenciais do sistema de detecção. Por exemplo, se supormos por um momento que o detector apresenta uma melhor resposta para a obtenção de espectros SERS na região Stokes, isto significaria uma boa resposta para o lado anti-Stokes para radiação em 785 nm. Só para comparar, a banda em 1600 cm^{-1} no lado anti-Stokes para excitação em 785 nm corresponde a um comprimento de onda de,

aproximadamente, 697 nm, que para a radiação excitante em 632,8 nm corresponde a uma frequência no espectro Raman no lado Stokes de aproximadamente 1465 cm^{-1}. Portanto, para investigar se há um problema com a resposta na região anti-Stokes para excitação em 632,8 nm, apresentamos na Figura 50 um espectro Raman normal do nitrobenzeno (líquido puro) nas regiões anti-Stokes e Stokes para este comprimento de onda de excitação.

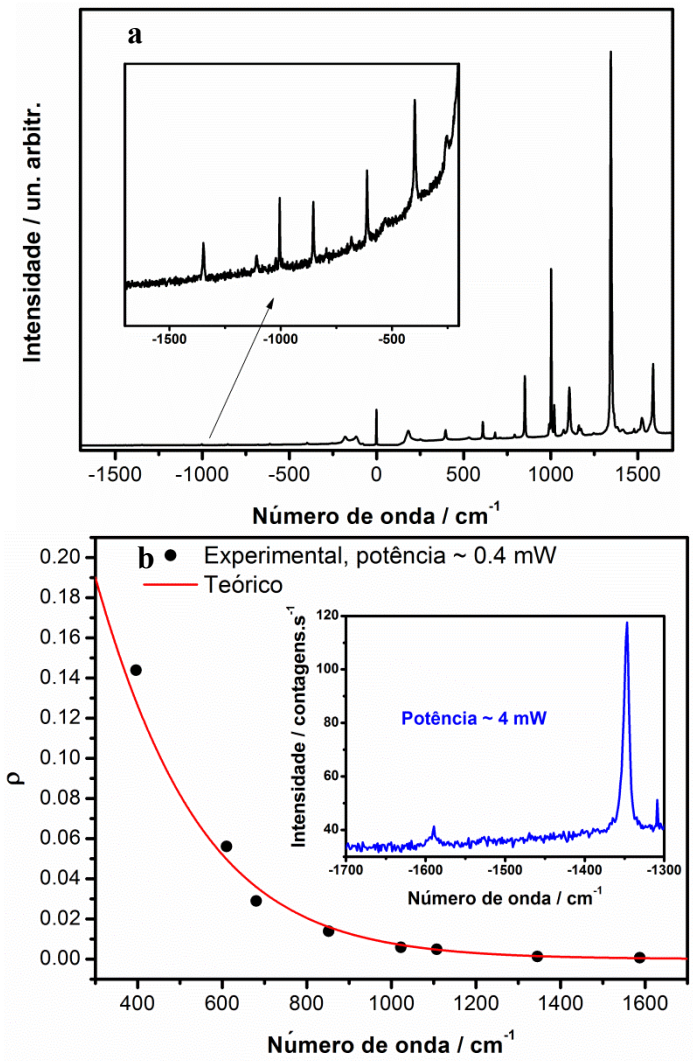


Figura 50: a) Espectro Raman normal de nitrobenzeno (líquido puro) nas regiões anti-Stokes e Stokes obtido para radiação excitante em 632,8 nm (potência ~0,4 mW). O detalhe da figura é uma ampliação da região anti-Stokes. b) Comparação entre as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes (ρ) para algumas bandas no espectro do nitrobenzeno (pontos pretos) e um ajuste (linha vermelha) segundo a Eq. 7 do Capítulo 3. O detalhe na figura mostra um espectro Raman normal na região anti-Stokes para o naftaleno com obtido com maior potência para a observação da banda em *ca*. 1590 cm^{-1}.

A análise da Figura 50b mostra que as relações anti-Stokes/Stokes (ρ) para algumas bandas do nitrobenzeno (círculos pretos) se ajustam muito bem ao modelo da Eq. 7 do Capítulo 3 (linha vermelha), mostrando que a resposta do CCD não é preferencial para o lado

Stokes para excitação em 632,8 nm e, portanto, tais argumentos serão descartados como possíveis explicações para os resultados apresentados nas Figuras 1 e 2.

Os espectros apresentados na Figura 48b e Figura 48d são representativos dos eventos de maior intensidade SERRS na sequência temporal nos lados anti-Stokes e Stokes, respectivamente, para radiação laser em 785 nm. Apesar da grande semelhança entre os espectros SERRS médio de BG e CV apresentados no capítulo anterior, principalmente na região de alta frequência, podemos notar algumas diferenças, dentre elas a presença de uma banda em *ca*. 1530 cm^{-1} no espectro do CV e a ausência da mesma no espectro do BG. Nos espectros mais intensos no lado Stokes para radiação em 632,8 nm e 785 nm é possível observar tal banda, o que indica uma maior contribuição da molécula CV nestes espectros. Ao contrário, nos espectros mais intensos no lado anti-Stokes para radiação em 785 nm tal banda não é observada na maioria dos espectros, os quais se assemelham muito ao espectro do BG. Este resultado é bastante interessante e pode ser interpretado em vista das ressonâncias CE estimadas no capítulo anterior. A radiação espalhada para o anti-Stokes em *ca*. 1530 cm^{-1} corresponde a um comprimento de onda de ~700 nm, o que está em pré-ressonância com a banda de ressonância CE estimada para a interação entre o BG e o metal. Esta possível pré-ressonância pode ser um fator extra para as intensidades dos eventos correspondentes ao BG, relativamente ao CV, o que permite uma maior probabilidade de se observar eventos de alta intensidade SERRS para o BG.

Como a ressonância de plasmon está afetando as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes neste substrato de forma diferente do caso do eletrodo ORC, sugerimos que esta ressonância de plasmon também possa ter contribuição nestes resultados experimentais. Para tentar entender a contribuição de ressonâncias de plasmon nos valores de ρ bem como nos espectros em 632,8 nm e 785 nm acima, foram realizadas simulações eletromagnéticas para este sistema via teoria de Mie e DDA, apresentados a seguir.

Para verificar a validade da utilização das simulações eletromagnéticas (DDA e teoria de Mie) da resposta óptica de nanopartículas para aplicação no estudo do efeito SERS, na Figura 51 e na Figura 52 são apresentados espectros UV-Vis (extinção) de suspensões coloidais de nanopartículas esféricas de Au e Ag de dimensões ~40 e ~50 nm de raio, respectivamente.

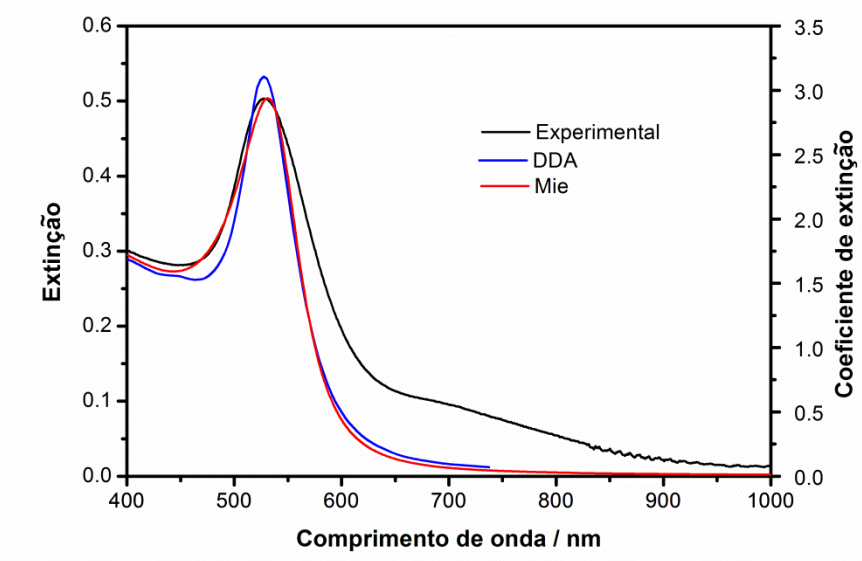


Figura 51: Comparação entre os espectros de extinção experimental e simulados (Teoria de Mie e DDA) para nanopartículas de Au de 40 nm de diâmetro.

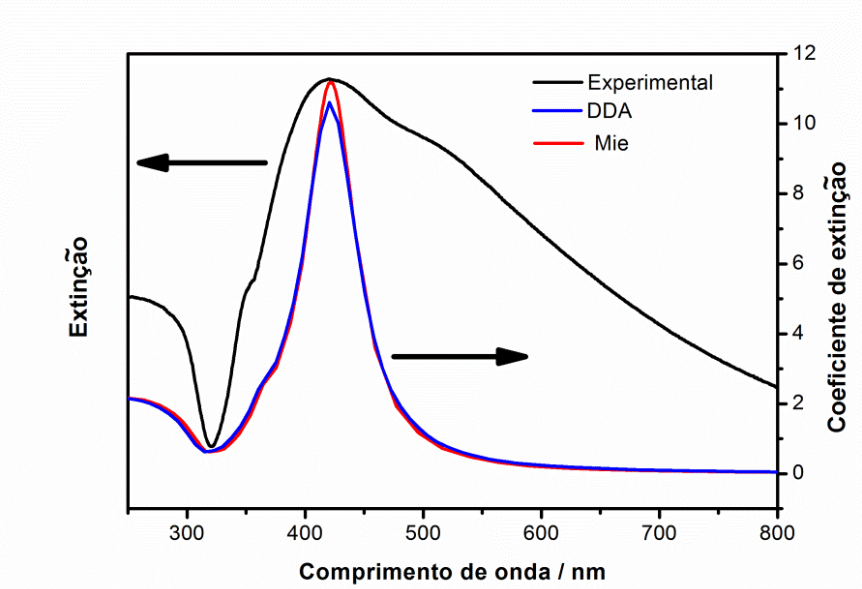


Figura 52: Comparação entre os espectros de extinção experimental e simulados (Teoria de Mie e DDA) para nanopartículas de Ag de 50 nm de diâmetro.

Observa-se na Figura 51 que as simulações DDA e pela teoria de Mie são capazes de reproduzir bem o espectro de extinção de nanoesferas de Au, sobretudo a simulação pela

teoria de Mie, que apresenta uma maior correlação com o espectro experimental na região em *ca*. 500 nm. Isto possivelmente se deve, além do fato de que a teoria de Mie corresponder a uma solução exata para o problema eletromagnético, que a simulação foi realizada utilizando o modelo de Etchegoin e *col*. [93] para a função dielétrica do Au. Este modelo tem por base a tentativa de uma melhor descrição da contribuição de transições interbandas para a função dielétrica deste metal, o que é de grande importância para a região do azul no espectro eletromagnético. Desta forma, o resultado do cálculo sugere a melhor descrição de transições interbandas para a resposta óptica do Au pelo modelo de Etchegoin e *col*.. Para comprimentos de onda acima de 550 nm os espectros calculados pelas duas simulações são muito semelhantes, o que mostra que a simulação DDA empregada é perfeitamente capaz (com a compilação de dados experimentais para a função dielétrica) de calcular a resposta óptica de nanopartículas metálicas. Porém, observa-se que a largura da banda no espectro experimental é maior que nas simulações, o que pode ser devido ao fato de que as nanopartículas sintetizadas apresentam uma dispersão de tamanhos e, possivelmente, de formas, que desviam um pouco do esférico.

No caso das nanopartículas de Ag o espectro calculado pelo método DDA através da Eq. 67 apresenta perfeita correlação com o espectro calculado através da teoria de Mie (Eq. 62), o que novamente mostra a eficácia do método DDA empregado. Porém, um maior desvio entre os espectros simulados e o experimental é observado. Embora, o comprimento de onda de máximo é perfeitamente reproduzido nos espectros simulados, o espectro experimental apresenta um formato muito mais alargado que os simulados, além da presença de um ombro bem pronunciado em *ca*. 550 nm. Um ombro em *ca*. 700 nm também é observado no espectro de extinção da suspensão coloidal de Au, porém, bem menos pronunciado que no caso do coloide de Ag. Sugerimos duas possibilidades para este ombro observado em maior

comprimento de onda: as nanopartículas sintetizadas apresentam algum grau de agregação e/ou a síntese levou a uma distribuição de nanopartículas de maiores dimensões.

As duas possibilidades podem agir simultaneamente em maior ou menor extensão. Porém, o ombro com máximo em ~ 530 nm no espectro de extinção das nanopartículas de Ag apresenta comprimento de onda que está abaixo do esperado para agregados de nanopartículas de Ag em solução, como será mostrado neste capítulo. Desta forma, consideramos que a principal fonte para o ombro em ~ 530 nm no coloide de Ag é a presença de nanopartículas com dimensões superiores aos 25 nm de raio esperados de acordo com o procedimento de Lee e Meisel.

Através da teoria de Mie, efetuamos simulações de espectros de extinção para nanoesferas de diferentes raios. Na Figura 53 é apresentado o espectro calculado para uma nanoesfera de 55 nm de raio, que apresenta uma banda com máximo em ~ 530 nm com maior largura que reproduz de forma satisfatória o formato do espectro experimental para maiores comprimentos de onda. Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura do coloide agregado com KBr (Figura 54) mostram a existência de nanopartículas com diâmetros ~100 nm e superiores, como esperado através do cálculo via teoria de Mie.

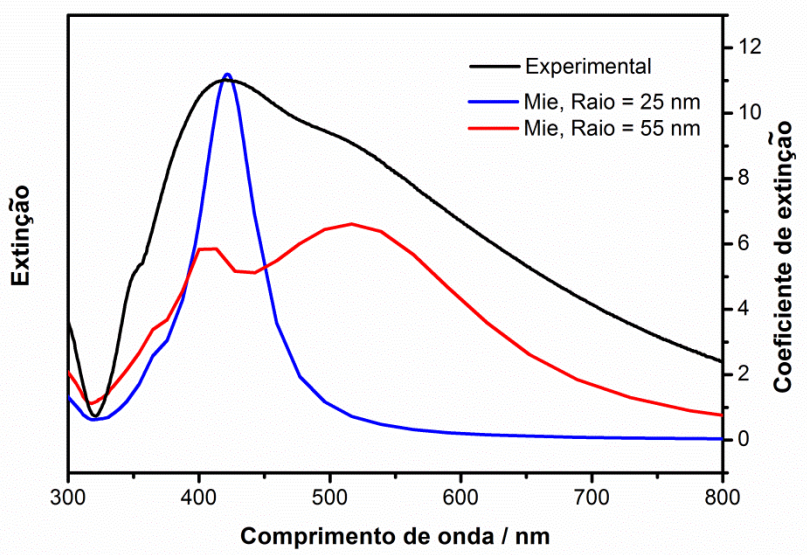


Figura 53: Comparação entre os espectros de extinção experimental e os simulados pela Teoria de Mie para nanopartículas de Ag de 50 nm e 110 nm de diâmetro.

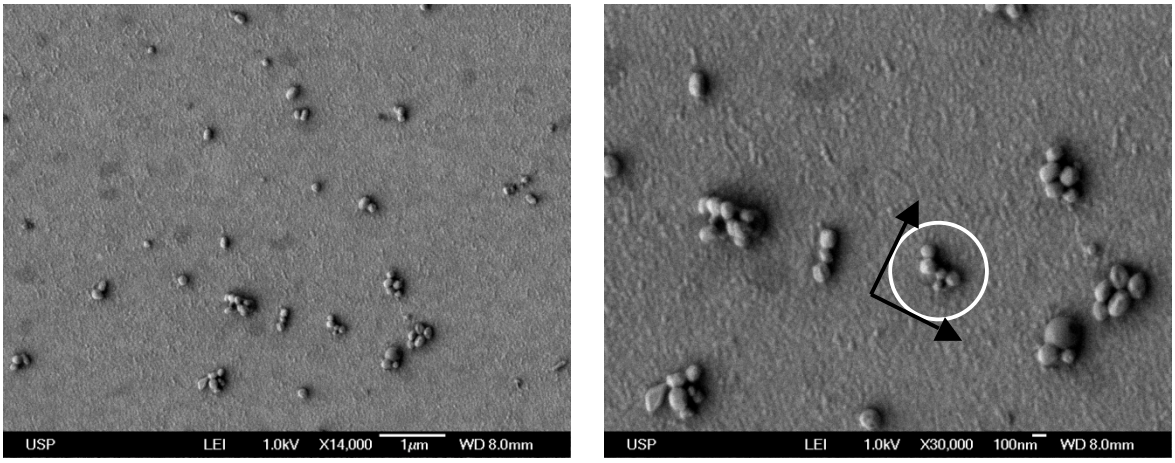


Figura 54: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) das nanopartículas de Ag sintetizadas pelo método de Lee e Meisel após agregação com KBr (10 mM).

Nas imagens SEM pode ser observada uma variedade de diferentes agregados de esferas de Ag, sendo algumas dessas esferas com diâmetro até bastante superior a 110 nm, as quais não devem contribuir de forma expressiva para as intensidades SERRS, já que a intensificação SERS é menor para partículas metálicas muito grandes como essas, devido ao fato de que o tamanho da partícula é muito próximo ao comprimento de onda de excitação (neste caso 632,8 nm e 785 nm). Nesta situação, contribuições de modos de maior ordem (quadrupolo, octapolo, etc) passam a ter maior contribuição na região do visível, os quais levam a menores intensificações de campo elétrico local. Portanto tais estruturas de tão grandes dimensões não serão consideradas nas análises posteriores. Desta forma, consideramos apenas as contribuições de nanoesferas de 25 e 55 nm de raio para a intensificação SERS em 4 situações: 3 modelos de "*hot spots*" formados por dímeros dessas nanoesferas (dímeros: 25 nm - 25 nm, 25 nm - 55 nm e 55 nm - 55 nm, separados por distâncias g ~ 1nm) cujos espectros de extinção simulados pelo método DDA são apresentados na Figura 55, e um agregado como o demarcado pelo círculo branco na Figura 54 (espectro de extinção simulado na Figura 57).

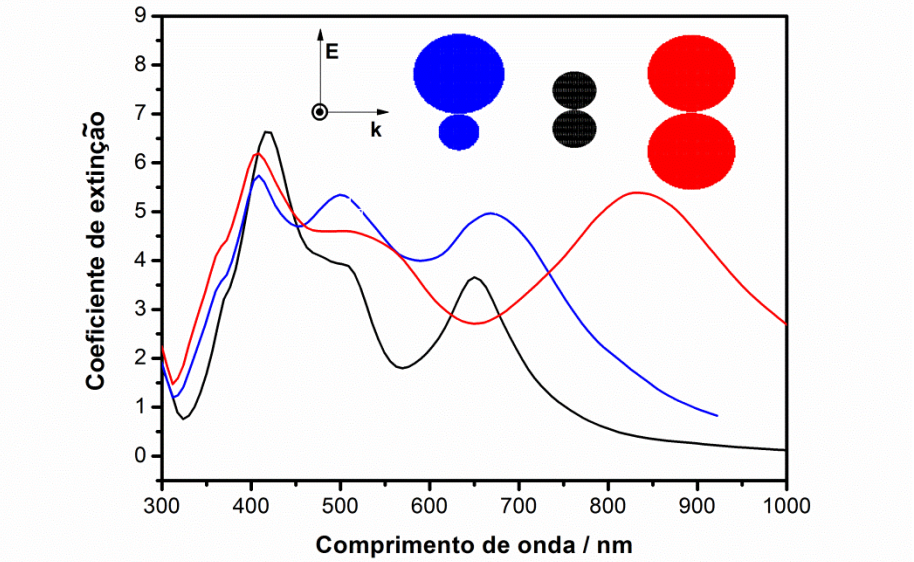


Figura 55: Espectros de extinção simulados pelo método DDA para os dímeros formados por nanoesferas de 25 e 55 nm de raio, indicados na figura.

Os espectros DDA da Figura 55 para cada dímero foram simulados para duas orientações de campo elétrico (**E**): paralelo e perpendicular ao plano do papel e a direção de propagação deste campo elétrico excitante é descrita pelo vetor de onda **k**, como indicado na figura. No espectro para o dímero 25 nm - 25 nm (linha preta na Figura 55) a banda de menor comprimento de onda corresponde à excitação (dipolar) de plasmon de superfície das nanopartículas individuais e a banda de maior comprimento de onda no espectro corresponde ao acoplamento dipolar destas ressonâncias individuais. A banda de energia intermediária, identificada no espectro através de um ombro em *ca*. 500 nm, é originada através da contribuição de modos de maior ordem, por exemplo, quadrupolar. Isto é evidenciado no caso do dímero 25 nm -55 nm, onde esta banda em torno de 500 nm é mais intensa no espectro deste dímero, o que se deve ao fato de que contribuições quadrupolares passam a ter maior importância conforme o aumento no tamanho da nanopartícula. [16, 21, 101]

As bandas de maior comprimento de onda nos espectros para os dímeros 25 nm - 55 nm e 55 nm - 55 nm, de forma semelhante ao exposto acima, podem ser atribuídas ao acoplamento (dipolar) entre os modos de excitação de dipolo das nanopartículas individuais. Nota-se que este modo de acoplamento dipolar apresenta-se deslocado para vermelho em

relação aos modos de dipolo das nanopartículas individuais. Dentre os três dímeros, o menor deslocamento é observado para o dímero 25 nm - 55 nm, o que se deve, provavelmente, à menor eficiência para este acoplamento devido à diferença de energias dos modos de excitação das nanopartículas individuais (~430 nm e ~520 nm, para as nanopartículas de 25 nm e 55 nm de raio, respectivamente). Por fim, as bandas em menores comprimentos de onda nos espectros em vermelho e azul (~408 nm) correspondem à ressonância de quadrupolo das nanopartículas individuais de 55 nm [21]

O acoplamento dipolar entre modos de excitação dipolo de nanopartículas individuais é normalmente o mais importante para o efeito SERS, pois contribui para um maior valor de intensificação local do campo elétrico ($|g(\omega_0)|$) a uma dada frequência ω_0, , e consequentemente do fator de intensificação $EF_{EM} \approx |g(\omega_0)|^4$, como mostrado para o caso do dímero 25 nm - 25 nm (Figura 56a).

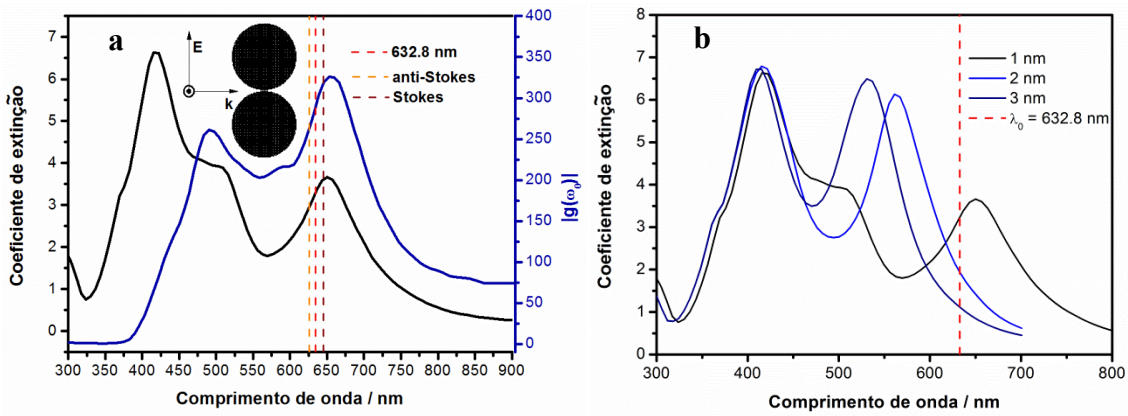


Figura 56: Simulações DDA para: a) Espectro de extinção para o dímero de nanoesferas de 25 nm (preto) separadas por 1 nm de distância e perfil do fator de intensificação do campo elétrico ($|g(\omega_0)|$, onde $EF_{EM} \approx |g(\omega_0)|^4$) no "*hot spot*" (azul); b) Espectros de extinção para nanoesferas de prata 25 nm separadas por 1, 2 e 3 nm.

Na Figura 56a observa-se que o perfil de intensificação do campo elétrico no "*hot spot*" segue o mesmo perfil do espectro de extinção, onde se nota que a intensificação para o acoplamento entre modos dipolares em ~650 nm leva a uma maior intensificação SERS. Como pode ser visualizado na figura, este "*hot spot*" apresenta ressonância deslocada para o lado Stokes do espectro se considerada radiação laser excitante em 632,8 nm. Estes "*hot spots*" formados por dímeros de esferas de 25 nm são os que mais contribuem para a

intensidade SERS em 632,8 nm. Agregados com mais nanopartículas (trímeros, por exemplo) apresentariam ressonâncias dipolares ainda mais deslocadas para o vermelho. Estes "*hot spots*" simulados são para uma distância interpartículas de 1 nm, o que não necessariamente corresponde à situação experimental, ou seja, há uma distribuição de "*hot spots*" com diferentes distâncias interpartículas, as quais apresentam ressonâncias em diferentes frequências, como indicado pelas simulações DDA da Figura 56b.

Se considerarmos (como uma aproximação) que os resultados das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes em coloide do Capítulo 3 são provenientes de "*hot spots*" formados por dímeros 25 nm – 25 nm, a distribuição de distâncias interpartículas entre 1 e 2 nm irá ditar se ocorre intensificação preferencial para o lado anti-Stokes ou Stokes. Lembrando que a contribuição CE foi estimada como contribuindo mais para intensificação do lado Stokes, a exclusão da mesma levaria à conclusão (considerando o histograma centrado no valor esperado, térmico, para ρ) de que a contribuição eletromagnética estaria contribuindo ligeiramente para intensificação do lado anti-Stokes, o que seria obtido pela distribuição de distâncias interpartículas mais próximas de 2 nm. Além disso, o intervalo de valores no histograma de ρ apresentado no Capítulo 3 para este substrato mostra que a contribuição eletromagnética para este coloide não é tão grande como no caso do eletrodo ORC, o que está relacionado à largura das ressonâncias eletromagnéticas neste substrato, o que será melhor abordado mais adiante neste capítulo.

Os resultados das Figura 47 e Figura 48 para as intensidades anti-Stokes e Stokes nas radiações 632,8 nm e 785 nm podem ser interpretados por meio destas simulações DDA. Radiação espalhada para o lado anti-Stokes para um modo com frequência em 1600 cm^{-1} apresenta comprimento aproximadamente igual a 575 nm e 697 nm, para excitação em 632,8 nm e 785 nm, respectivamente. Se considerarmos "*hot spots*" formados pelos dímeros 25 nm - 25 nm e 55 nm - 55 nm, estas radiações espalhadas apresentam comprimentos de onda muito

próximos a um mínimo nos espectros de extinção, ou seja, não esperaríamos intensificação suficiente para visualizarmos a banda em -1600 cm^{-1} no espectro SERS para nenhuma das radiações. De fato, como discutido, não esperamos que existam "*hot spots*" na região de baixa frequência que apresentem intensificação suficiente para a observação de espectros de uma única molécula, nem mesmo para o caso do dímero 25 nm - 25 nm com distância interpartículas igual 3 nm. Apesar deste dímero apresentar ressonância em 565 nm, muito próximo do comprimento de onda para a radiação espalhada, a radiação excitante em 632,8 nm encontra-se fora de ressonância com a excitação deste plasmon de superfície, tornando inviável a observação de espectros SERS de uma molécula.

Para o caso da radiação em 785 nm, o mesmo argumento não pode ser utilizado, já que uma variedade de agregados de nanopartículas pode apresentar ressonância na região do vermelho, ou seja, deve existir algum agregado que permita intensificação nos comprimentos de onda das radiações excitante e espalhada. Para mostrar tal situação foram realizadas simulações DDA para descrever o agregado demarcado na imagem SEM (Figura 54). Os resultados estão apresentados na Figura 57 (espectro de extinção) e Figura 58 (Mapas do fator de intensificação EF_{EM} para excitação em 785 nm, radiação espalhada deslocada para o anti-Stokes em 1600 cm^{-1} e duas diferentes polarizações do campo elétrico desta radiação excitante).

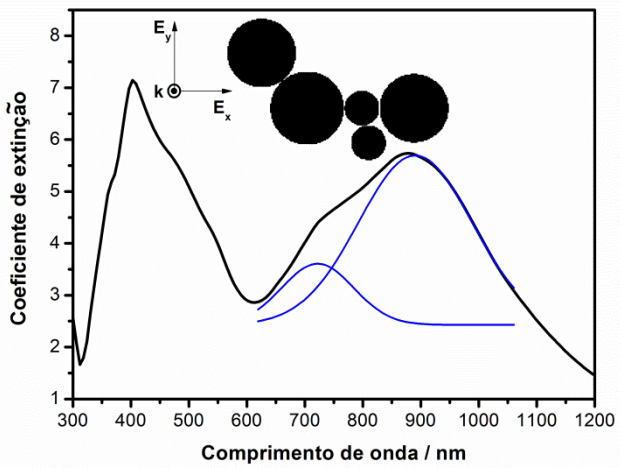


Figura 57: Espectro de extinção simulado pelo método DDA para o agregado de nanopartículas de Ag de 25 e 55 nm de raio esquematizada na figura. Em azul é apresentado um ajuste de curvas.

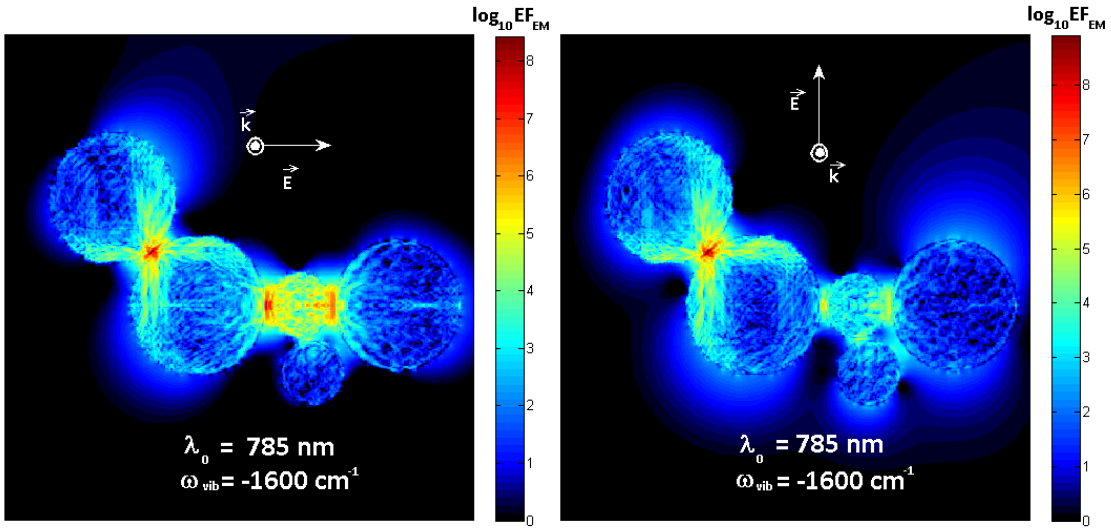


Figura 58: Mapas do fator de intensificação EF_{EM} em torno do agregado de nanoesferas simulados pelo método DDA. Os valores de EF_{EM} em cada mapa foram calculados considerando-se radiação excitante em 785 nm e espalhada em 697 nm (~1600 cm^{-1} para o lado anti-Stokes). Os resultados são apresentados para diferentes polarizações do campo elétrico da radiação excitante.

Observam-se no espectro simulado duas bandas de ressonância em 879 nm (próxima ao comprimento de onda da radiação excitante em 785 nm) e em 728 nm (próxima ao comprimento de onda da radiação espalhada em -1600 cm^{-1}, ou seja, ~697 nm). Portanto, tanto a radiação incidente quanto a espalhada em -1600 cm^{-1} estão em condições de ressonância para este agregado, ou seja, em princípio esta banda em 1600 cm^{-1} no lado anti-Stokes poderia ser observada no espectro SERS de uma molécula caso exista neste agregado um "*hot spot*" que permita fator de intensificação acima de 1.10^8. Para verificar este fato, na Figura 58 são apresentados mapas de fatores de intensificação SERS para excitação em 785 nm e radiação espalhada com frequência em ~1600 cm^{-1} deslocada para o lado anti-Stokes. Os fatores de intensificação foram calculados baseados na Eq. 12 do Capítulo 3, ou seja,

$$EF_{EM} = |g(785nm)|^2 . |g(697nm)|^2$$

Os valores dos fatores de intensificação obtidos para as duas polarizações indicam a possibilidade de detecção de espectros de uma única molécula através deste aglomerado de nanopartículas. Além disso, como já discutido anteriormente, a radiação espalhada está dentro da banda de ressonância da contribuição CE estimada para o BG, o que leva a um fator de intensificação extra para os valores simulados através da simulação DDA.

As ressonâncias simuladas pelo método DDA parecem, de acordo com os mapas do fator de intensificação, ter contribuição da excitação do "*hot spot*" formado pelas esferas de 55 nm de raio (lado esquerdo do agregado) e da excitação dos "*hot spots*" formados pelo trímero de esferas de 55 nm - 25 nm - 55 nm de raio. A banda em 879 nm apresenta uma maior contribuição da excitação do dímero e a banda em 728 nm apresenta uma maior contribuição da excitação do trímero. Porém, estes modos são acoplados, o que permite, por exemplo, que o "*hot spot*" formado pelo dímero 55 nm - 55 nm apresente alto fator de intensificação mesmo para comprimento de onda em ~700 nm, e é isso o que permite a obtenção de fatores de intensificação acima do necessário para observação de uma molécula para este agregado.

4.3.2. - Sobre as larguras de ressonâncias em substratos com múltiplos "hot spots"

Esta sessão tem como propósito investigar a possibilidade de obtenção de contribuições EM cujas ressonâncias apresentem larguras da ordem de 800 cm^{-1} ou inferiores. Se tomarmos como exemplo o caso do "*hot spot*" formado pelo dímero de nanopartículas de 25 nm de raio separadas por uma distância de 1 nm, a largura do perfil de $|g(\omega_0)|$ para a ressonância dipolar do dímero é da ordem de 1300 cm^{-1}, muito superior ao esperado para as altas relações de intensidade anti-Stokes/Stokes observadas no Capítulo 3 para o eletrodo ativado, o qual deve apresentar "*hot spots*" formados por agregados de nanopartículas mais complexos do que este modelo de dímero. A formação de agregados normalmente leva a um alargamento da banda de ressonância de plasmon de superfície devido a maior probabilidade de relaxação por espalhamento. [102] Este é o caso do agregado de nanoesferas simulado na sessão anterior, o que dificulta nossa interpretação dos valores para as relações de intensidade anti-Stokes/Stokes em eletrodo ativado como discutido no capítulo anterior.

Esta largura está relacionada à dinâmica eletrônica após a excitação dos modos de plasmon de superfície, a qual pode ser descrita através das propriedades ópticas do metal, ou

seja, através da função dielétrica. [5] Porém, outros fatores também influenciam nesta dinâmica como a temperatura e (não menos importante) a geometria das nanopartículas. A diferença entre as larguras da ressonância de plasmon de superfície para nanopartículas individuais de diferentes geometrias pode ser visualizada, por exemplo, nas referências [102-103], onde se pode observar, que nanobastões podem apresentar ressonâncias bem mais finas que nanoesferas. Este fato motivou a simulação DDA de nanobastões à procura de um sistema modelo que nos auxilie na interpretação dos resultados do capítulo anterior, ou seja, nosso objetivo nesta sessão é procurar condições de ressonância com larguras que sejam da ordem de 700-800 cm^{-1} para agregados de nanobastões. Um outro aspecto relevante a ser considerado são os trabalhos de Schatz e *col*. que descrevem através de simulações eletromagnéticas (sobretudo DDA) que arranjos 1D e 2D de nanopartículas separadas por distâncias da ordem do comprimento de onda de ressonância podem apresentar ressonâncias extremamente finas, devido às interações eletromagnéticas nestas distâncias. [104-106] Porém, tais distâncias não nos auxiliam em nossa investigação, pois não permitem a geração de "*hot spots*" e, portanto, procuramos nesta sessão, através de simulações DDA, investigar agregados de nanobastões que possam levar, através de interações eletromagnéticas, (interferência) à obtenção de bandas com as larguras desejadas. Apesar destas simulações não serem realizadas para nanoestruturas mais complexas como é o caso da superfície do eletrodo ativado de Ag ORC, elas têm apenas o objetivo de mostrar, através de um sistema simples, a possibilidade de interações eletromagnéticas que permitam a obtenção de ressonâncias de plasmon de superfície mais finas que tornem os resultados apresentados anteriormente possíveis.

Nanobastões de Au têm sido amplamente aplicados em estudos SERS [107-110] ou em plasmônica em geral [111-113] devido à característica de se poder controlar a posição da ressonância de plasmon de superfície através do controle sobre a razão de aspecto [114] ou a

possibilidade de formação de agregados lineares [108] ("*end-to-end*", ou agregados J [113]) e agregados paralelos ("*side-by-side*", ou agregados H [113]), que permitem ainda maiores deslocamentos da posição da banda de ressonância de plasmon de superfície. Aproveitando esta vasta experiência na literatura sobre tais nanopartículas e sua aplicação em SERS, iniciamos esta sessão apresentando espectros de extinção DDA para nanobastões individuais e agregados de nanobastões separados por distâncias da ordem de 1 nm, para comparação com resultados na literatura. Na Figura 59 é apresentado o espectro de extinção de um nanobastão de ~41 nm de comprimento com razão de aspecto ~3,6.

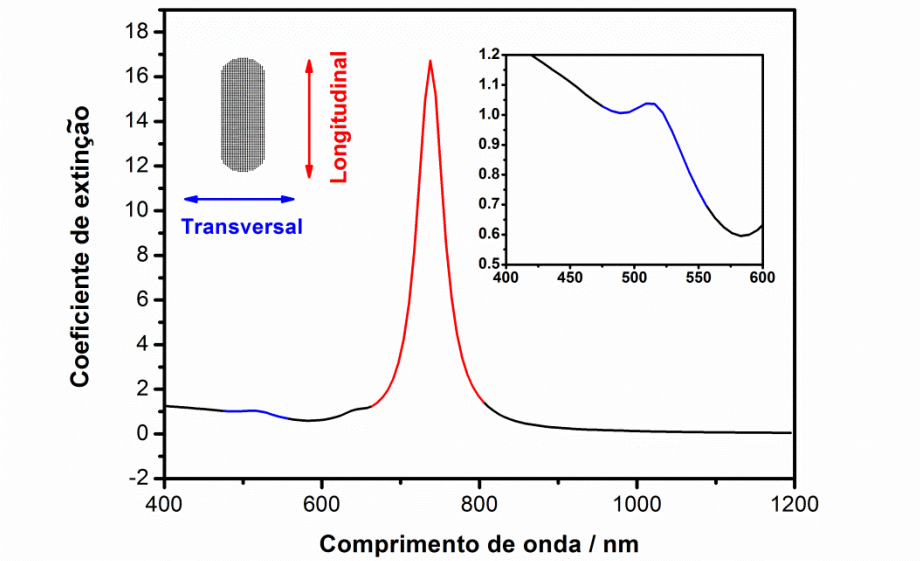


Figura 59: Espectro de extinção DDA para 1 nanobastão (esquematizado na figura). O espectro em detalhe corresponde a uma ampliação na região entre 400 e 600 nm.

No espectro do nanobastão é observada uma banda intensa em torno de 740 nm e uma bem menos intensa em torno de 500 nm, cuja intensidade é baixa devido à interferência da contribuição interbanda do Au. Este espectro apresenta grande concordância com simulações eletromagnéticas e resultados experimentais apresentados na literatura [107-108, 113]. A banda em 740 nm é atribuída à ressonância de plasmon longitudinal, enquanto que a banda em *ca*. 500 nm é atribuída ao modo transversal, como indicado na figura. A banda referente ao modo longitudinal é bastante fina (~745 cm^{-1} de largura), de acordo com o desejado. Porém, como dificilmente nanopartículas individuais como estas dão origem a espectros

SERS de uma única molécula, passamos a investigar "*hot spots*" formados por estes nanobastões na cofiguração linear ("*end-to-end*") e lateral ("*side*-by-side"). Na Figura 60a são apresentados espectros de extinção para diferentes agregados de nanobastões, a dizer: dois dímeros formados pela interação transversal e longitudinal (azul e vermelho, respectivamente) e um agregado de 4 nanobastões contendo tanto interação transversal quanto longitudinal (verde). Na Figura 60b é apresentado um mapa dos fatores de intensifivação EF_{EM} para o agregado de 4 nanobastões.

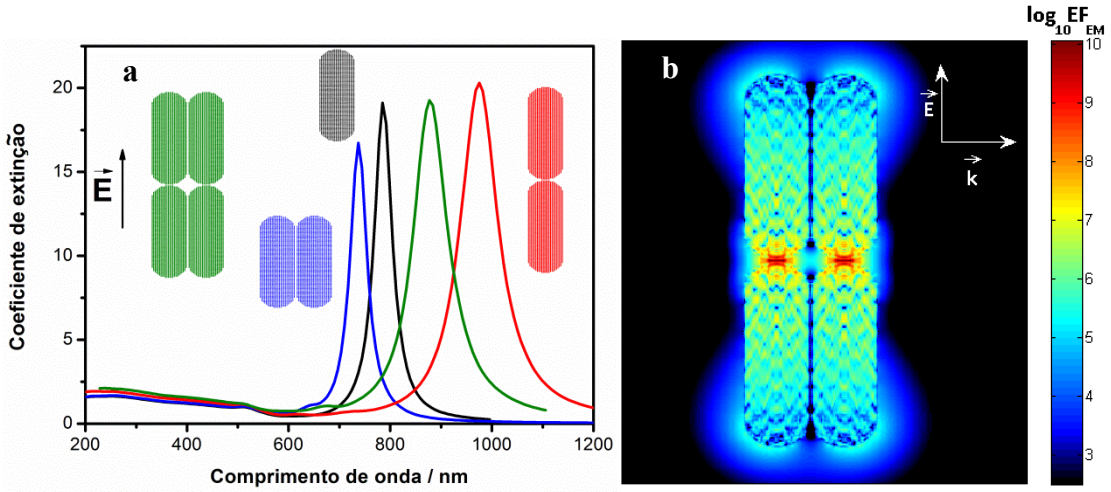


Figura 60: a) Espectros de extinção simulados pelo DDA para agregados de 2, 3 e 4 nanobastões comparados ao espectro para 1 nanobastão. b) Mapa do fator de intensificação SERS (EF_{EM}) para o agregado de 4 nanobastões.

Nos espectros apresentados na Figura 60a, não são observadas alterações significativas da banda em ~500 nm (modo transversal), ao passo que grandes alterações são observadas para o modo longitudinal. Estes resultados estão de acordo com a literatura [107-108, 111, 113] e, portanto, nos focaremos nas alterações referentes ao modo longitudinal com a agregação dos nanobastões. O dímero formado pela interação longitudinal (em vermelho) apresenta banda de ressonância de plasmon deslocada para o vermelho em relação à banda do espectro de 1 nanobastão, como esperado, baseado no que foi discutido para o caso do dímero de nanoesferas. Surpreendente é o fato de que a interação lateral (ou transversal) entre os nanobastões (em azul) leva a um deslocamento para o azul, enquanto que a banda para o

agregado de 4 nanobastões na figura (em verde) encontra-se em posição intermediária, devido ao caráter simultâneo de interação lateral e longitudinal.

Uma interpretação para os deslocamentos verificados acima pode ser feita baseada no modelo de excitons acoplados. Neste modelo, o acoplamento dos estados excitônicos de dois nanobastões individuais, os quais apresentam determinada energia, leva à formação de novos estados excitônicos, de forma semelhante à teoria de orbitais moleculares. Estes excitons são caracterizados por momentos de dipolo induzido. Portanto, no caso da interação longitudinal ("*end-by-end*") entre os nanobastões há duas possibilidades de interação entre os momentos de dipolo dos nanobastões individuais, interação paralela (soma dos momentos de dipolo) e antiparalela (substração dos momentos de dipolo induzidos). A primeira interação corresponde à situação de menor energia e caracteriza, portanto, o deslocamento para maiores comprimentos de onda no espectro. A outra interação entre os excitons levaria a um cancelamento do momento de dipolo induzido e, portanto, não caracteriza uma excitação de plasmon de superfície. Mais adiante será mostrado que quando não há cancelamento do momento de dipolo total, uma nova banda pode ser observada, com maior energia (menor comprimento de onda) em relação ao nanobastão individual.

No caso da interação lateral entre os nanobastões, o modelo de excitons acoplados sugere duas interações entre os momentos de dipolo induzido dos nanobastões, interação lateral em que os momentos de dipolo induzidos estão paralelos (soma) e antiparalelos (subtração), sendo que esta última não é permitida (momento de dipolo induzido total nulo). A primeira configuração caracteriza uma situação de maior energia devido a uma repulsão entre as cargas parciais induzidas com a excitação do plasmon de superfície. O modelo discutido acima está representado por um diagrama de energias, semelhante a um diagrama de orbitais moleculares, onde estas interações entre os excitons pode ser melhor visualizada.

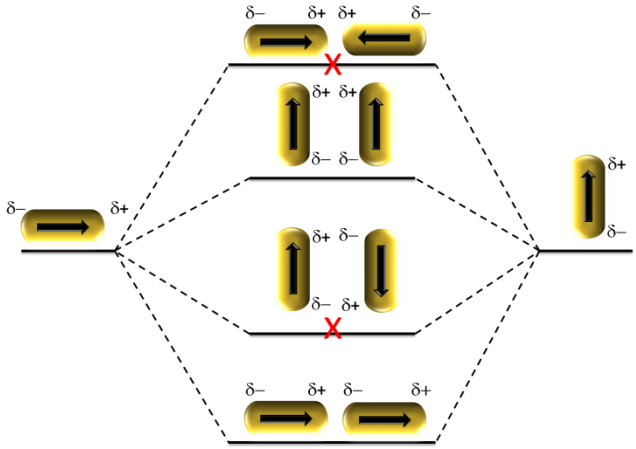


Figura 61: Diagrama de energia para interação dipolar entre excitons para a formação de dímeros de nanobastões.

Na Figura 60b observa-se que entre os nanobastões interagindo lateralmente, o fator de intensificação é significativamente menor que entre os nanobastões interagindo longitudinalmente. Isto também é observado para o caso de dois nanobastões (em azul da Figura 60a). O mapa do perfil de intensificação para este agregado de dois nanobastões é apresentado na Figura 62a. Observa-se que o fator de intensificação na região entre os nanobastões é significativamente menor, relativamente a outras regiões da superfície do dímero, próximo a pontas dos nanobastões. Isto pode ser interpretado baseado na repulsão entre as cargas parciais, ou seja, interação entre campos elétricos (E) de orientações opostas (como indicado no esquema). Na Figura 62b são apresentados vetores campo elétrico no interior dos nanobastões e na Figura 62c uma ampliação da região próxima às pontas dos nanobastões, onde se vê claramente a orientação oposta dos vetores campo elétrico na região entre as nanopartículas, como esperado.

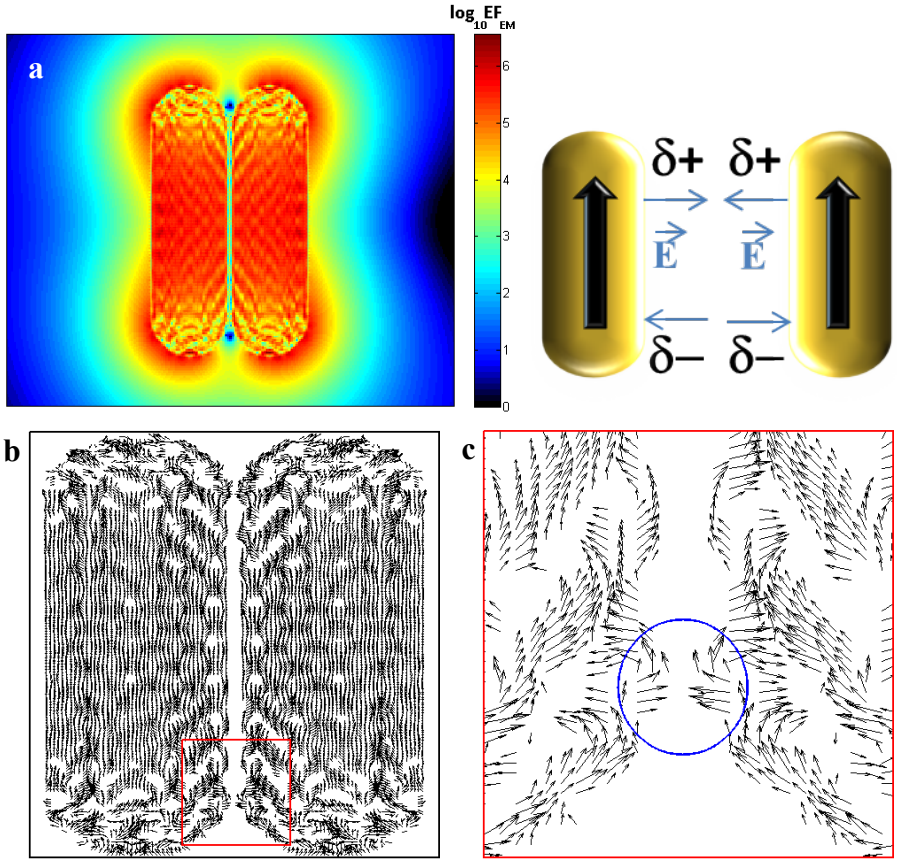


Figura 62: a) Mapa do fator de intensificação SERS (EF_{EM}) para o agregado de 2 nanobastões interagindo lateralmente. b) vetores campo elétrico no interior dos nanobastões. c) ampliação de b) na região demarcada com o quadrado vermelho.

Os resultados acima estão de acordo com o observado na literatura, tanto do ponto de vista experimental, quanto teórico. Os espectros apresentados acima não apresentam as larguras de ressonância desejadas. O acoplamento entre os modos de excitação de plasmons de superfície, como no caso das nanoesferas, leva a um aumento da largura de ressonância. O sistema com 4 nanobastões simulado acima apresentou comportamento muito semelhante ao caso do dímero de nanobastões interagindo lado a lado. Isto se deve à simetria dos dois sistemas, o que leva alguns estados excitônicos serem proibidos. Portanto, prosseguimos com a análise de um sistema onde se quebra esta simetria, com três nanobastões efetuando interações longitudinal e transversal, como indicado no detalhe da Figura 63, onde também são apresentados o espectro de extinção e o perfil do fator do campo elétrico da radiação excitante ($|g(\omega_0)| \approx EF_{EM}{}^{1/4}$) no "*hot spot*" indicado na figura.

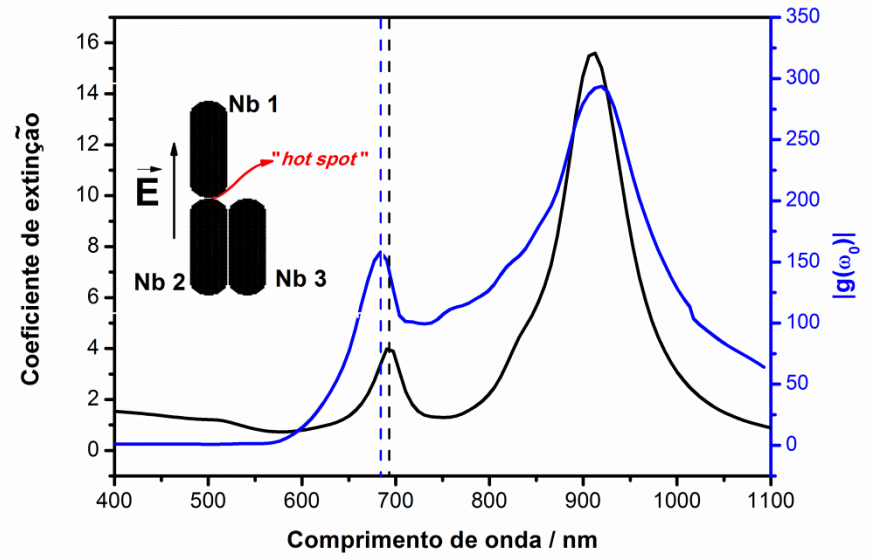


Figura 63: Simulação DDA para o espectro de extinção (preto) e para o fator de intensificação $|g(\omega_0)|$ para o campo elétrico da radiação excitante no "*hot spot*" formado pelo trímero de nanobastões esquematizado na figura.

O espectro de extinção da Figura 63 mostra a existência de mais bandas que no caso dos agregados de nanobastões simulados acima: observa-se uma banda em ca. 700 nm e um ombro em *ca*. 850 nm. Isto se deve à quebra de simetria, que torna permitido modos proibidos de acoplamento de excitons nos agregados anteriores. Para facilitar a discussão, os nanobastões foram caracterizados por Nb 1, Nb 2 e Nb 3,como indicado na figura.

Na Figura 63 também é apresentado o perfil do fator de intensificação em função do comprimento de onda, em que se observam máximos deslocados dos referentes ao espectro de extinção. Tomemos, por exemplo, o caso da "nova" banda em 700 nm, para a qual são apresentadas linhas verticais tracejadas para mostrar a posição dos máximos das bandas, permitindo-se observar claramente a diferença entre essas posições. A escolha desta banda para análise tem vários motivos. Além do seu deslocamento no espectro de extinção e no perfil de intensificação, esta banda não apresenta um perfil usual, do tipo Lorentziano, ou seja, ela apresenta um formato mais assimétrico. Isto pode ser melhor visualizado através da análise dos espectros de absorção e espalhamento que compõem o espectro de extinção (extinção = absorção + espalhamento), apresentados na Figura 64, onde se nota mais facilmente a assimetria da banda no espectro de espalhamento.

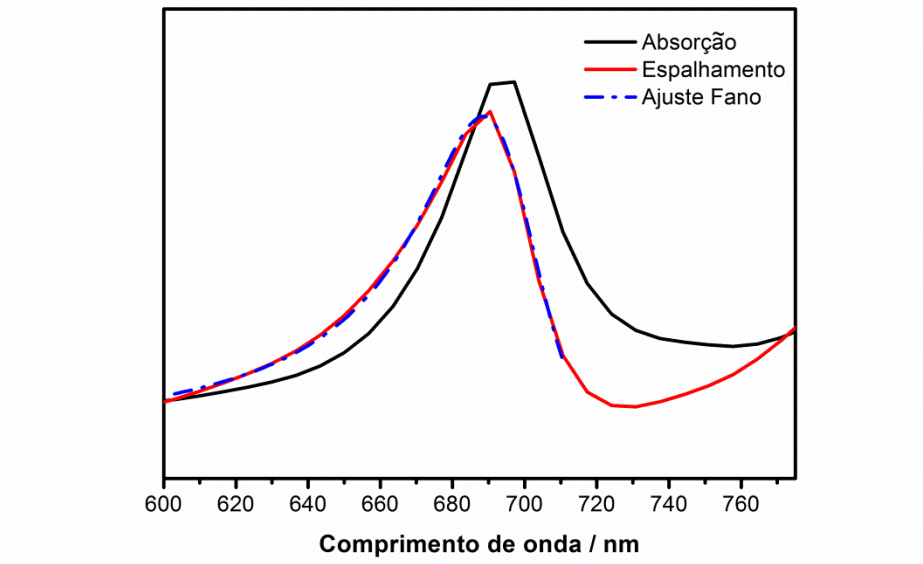


Figura 64: Espectros de espalhamento (vermelho) e de absorção (preto) simulados pelo DDA para o trímero da Figura 63. Em azul apresentamos um ajuste de uma ressonância do tipo Fano.

O formato assimétrico, como é o caso da banda em ~700 nm no espectro de espalhamento, é característico de ressonância de Fano, descoberta por Ugo Fano em um estudo sobre estados de autoionização. [115-117] Essa ressonância tem uma dependência do tipo:

$$I(\omega) \propto \frac{(F\gamma + \omega - \omega_0)^2}{(\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2}$$

Eq. 70

onde I corresponde à intensidade da banda e γ, ω, e ω_0 têm o mesmo significado que no caso da ressonância Lorentziana. F é um fator que descreve o grau de assimetria em relação à função Lorentziana. Na Figura 64 é apresentado um ajuste (em azul) para o espectro de espalhamento utilizando o modelo de Fano, onde se observa uma ótima correlação entre a curva simulada pelo método DDA e o modelo de Fano. O ajuste nos fornece um valor para a largura γ de ~450 cm^{-1} para o espectro de espalhamento. Esta largura é bem inferior aos valores observados para os casos de sistemas simétricos, o que indica a possibilidade da obtenção de "*hot spots*" com pequena largura. A largura para o perfil de intensificação do campo elétrico excitante, $|g(\omega_0)|$, importante para as relações de intensidade anti-

Stokes/Stokes é de aproximadamente 750 cm^{-1}, ou seja, da ordem dos estimados para as ressonâncias que permitiram os maiores valores de κ apresentados no capítulo anterior.

A palavra chave para descrever a assimetria na ressonância de Fano é interferência [87, 116-121], neste caso específico interferência entre modos de excitação de plasmon de superfície. Portanto, para entendermos melhor a origem destas interferências precisamos recorrer a modelos que possibilitem a inclusão de tal fenômeno. Uma vez que estamos dando grande enfoque ao tratamento clássico para o mecanismo eletromagnético, inclusive através das simulações DDA, podemos interpretar os resultados obtidos através de um modelo de interferência entre osciladores, neste caso, osciladores acoplados.

Para um sistema de dois osciladores acoplados (sistema mais simples) sujeitos a uma força externa (campo elétrico excitante) pode-se escrever o seguinte sistema de equações de movimento:

$$\ddot{x}_1(t) + \gamma_1 \dot{x}_1(t) + \omega_1^2 x_1(t) + \chi_{12} x_2(t) = a_i e^{-i\omega t}$$
$$\ddot{x}_2(t) + \gamma_2 \dot{x}_2(t) + \omega_2^2 x_2(t) + \chi_{12} x_1(t) = 0$$

Eq. 71

onde $x_j(t)$, $\dot{x}_1(t)$, $\ddot{x}_j(t)$, correspondem à amplitude do vetor posição do oscilador j e suas respectivas velocidade e aceleração em dado instante de tempo t. γ_j é a resistência frente ao movimento oscilatório de j (constante de amortecimento). ω_j^2 e χ_{12} descrevem a frequência angular do oscilador j ($\omega_j^2 x_j(t)$ descreve a Lei de Hooke) e a constante de acoplamento entre os osciladores, respectivamente. a_1 é a amplitude da força externa (neste caso campo elétrico). Assumindo uma solução complexa do tipo $x_j(t) = C_j(\omega) e^{-i\omega t}$ onde $C_j(\omega)$ corresponde à amplitude (complexa da solução) e substituindo no sistema da Eq. 71 temos como soluções para $C_1(\omega)$ e $C_2(\omega)$:

$$c_1(\omega) = \frac{\omega_2^2 - \omega^2 + i\gamma_2\omega}{(\omega_1^2 - \omega^2 + i\gamma_1\omega)(\omega_2^2 - \omega^2 + i\gamma_2\omega) - \chi_{12}^2} a_1$$

Eq. 72

$$c_2(\omega) = \frac{-\chi_{12}}{(\omega_1^2 - \omega^2 + i\gamma_1\omega)(\omega_2^2 - \omega^2 + i\gamma_2\omega) - \chi_{12}^2} a_1$$

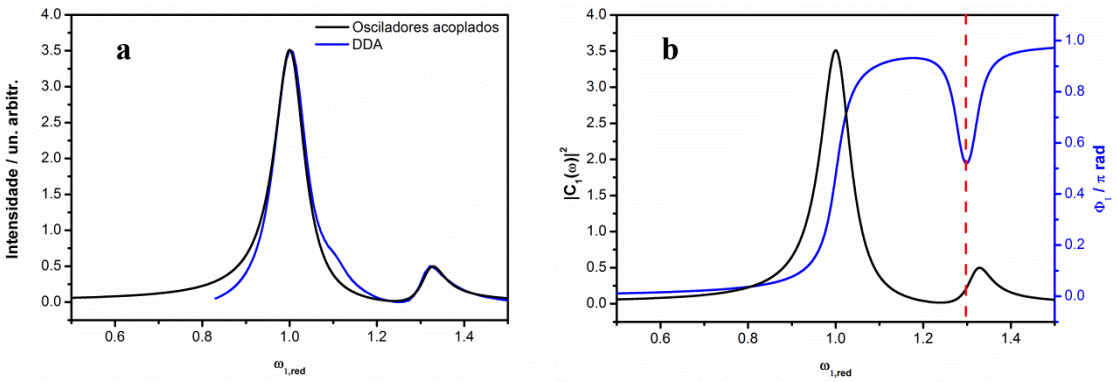
Eq. 73

A diferença de fase do oscilador em relação à força externa, $\phi_j(\omega)$, pode ser escrita como [87]:

$$\phi_j(\omega) = tg^{-1}\left(\frac{\gamma_j\omega}{\omega_j^2 - \omega^2}\right)$$

Eq. 74

Na Figura 65 são apresentados resultados da aplicação da Eq. 72 e Eq. 73 para a modelagem do espectro de espalhamento calculado pelo método DDA. Os resultados na figura correspondem à situação em que se obteve uma boa descrição do espectro de espalhamento através das equações de osciladores acoplados (Figura 65a). Apresentamos os resultados em função da frequência reduzida, $\omega_{1,red}$ que na realidade corresponde ao valor normalizado da frequência pela frequência de ressonância do oscilador 1.



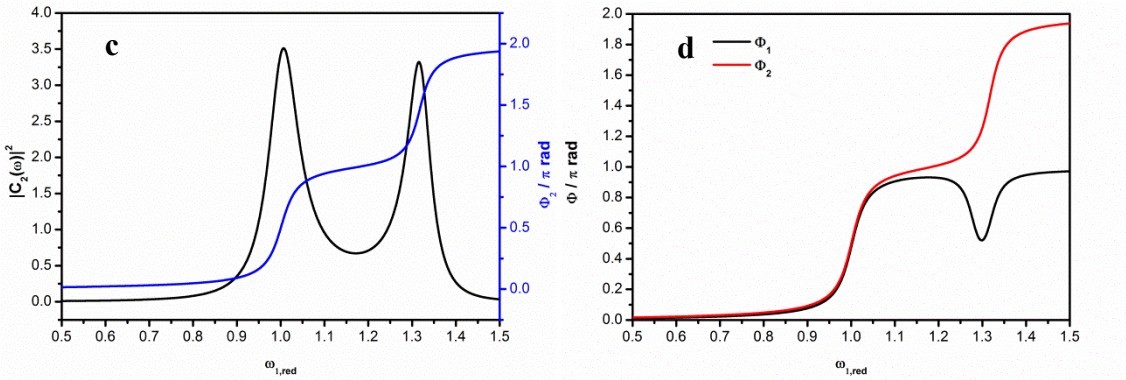


Figura 65: a) Simulação DDA (azul) do espectro de espalhamento para o trímero da Figura 63 e perfil da amplitude $C_1(\omega)$ utilizando o modelo de oscilares acoplados (Eq. 72). b) perfis em relação à frequência reduzida da amplitude $C_1(\omega)$ utilizando o modelo de oscilares acoplados (preto) e da diferença de fase do oscilador com relação à radiação excitante (azul); a linha pontilhada se refere à posição onde é observada a assimetria de Fano no espectro DDA. c) perfis da amplitude $C_2(\omega)$ utilizando o modelo de oscilares acoplados (preto) e da diferença de fase do oscilador com relação à radiação excitante (azul, Eq. 73). d) perfis da diferença de fase para o oscilador 1 (preto) e oscilador 2 (vermelho).

Na Figura 65a apresentamos a comparação entre o espectro de espalhamento DDA e o módulo da amplitude $C_1(\omega)$ (Figura 65c) em função da frequência reduzida. Note que a frequência de ressonância do oscilador 1 foi ajustada para a frequência de ressonância da banda de maior comprimento de onda nos espectros DDA. Como nosso modelo é simples e corresponde à interação entre apenas 2 osciladores, o ombro em torno de 850 nm ($\omega_{1,red}$~1,1) não pode ser descrito pelo mesmo, porém a Figura 65 mostra que a análise de osciladores acoplados pode perfeitamente reproduzir a assimetria da banda em ~700 nm (na figura, $\omega_{1,red}$~1,3), nosso foco de análise.

São apresentados na Figura 65 (b e c) os perfis das amplitudes de oscilação $C_1(\omega)$ e $C_2(\omega)$, além das diferenças de fase $\phi_1(\omega)$ e $\phi_1(\omega)$ em função da frequência reduzida, para as quais observamos uma intensa dependência com a frequência da radiação excitante. O perfil de $C_2(\omega)$ descreve as duas frequências de ressonância do sistema, ou seja, descreve o espectro de absorção dos dois osciladores quando acoplados, os quais apresentam frequências de ressonância muito próximas às frequências de ressonância dos dímeros longitudinal e transversal (espectros de absorção DDA são apresentados na Figura 66 para comparação).

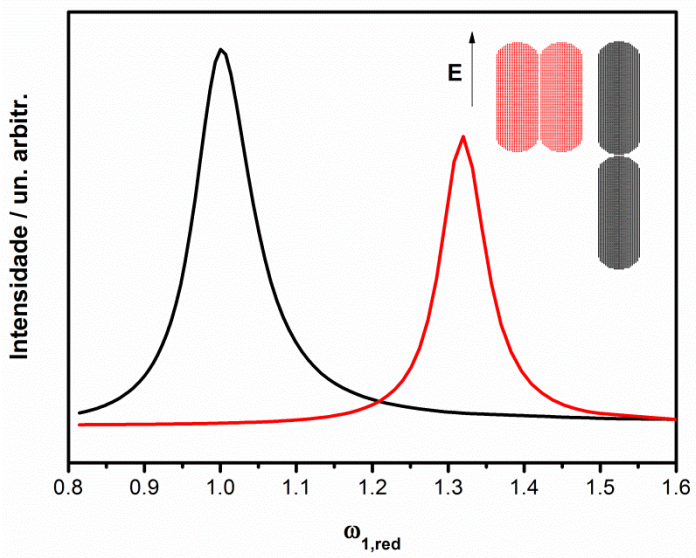


Figura 66: Espectros de absorção (DDA) para os dímeros de nanobastões esquematizados na figura.

Da Figura 66 nota-se que o perfil de $C_2(\omega)$ se assemelha bastante a uma soma dos espectros de absorção de cada um dos dímeros considerados (detalhe na figura), ou seja, pode-se atribuir os osciladores 1 e 2 aos modos de excitação de plasmon de superfície em cada um destes dímeros, isto é, o oscilador 1 nesta análise corresponderia à excitação de plasmon de superfície no dímero longitudinal (detalhe em preto na figura) enquanto que o oscilador 2 corresponderia ao modo de excitação de superfície do dímero lateral (em vermelho na figura). Portanto, a interferência na ressonância de Fano observada no espectro DDA pode ser interpretada, do ponto de vista clássico, através da interferência (destrutiva) entre estes modos de excitação nos dímeros. Isto ocorre quando a diferença de fase entre os osciladores é um múltiplo inteiro de π, o que ocorre para comprimento de onda em torno de 700 nm ou $\omega_{1,red}$ ~1,3, como pode ser observado Figura 65d. Nesta situação os osciladores correspondentes a excitação no dímero lateral e no dímero longitudinal apresentam uma diferença de fase de π rad, caracterizando a interferência destrutiva entre ambos os modos.

A análise acima, apesar de simples e de não poder explicar todas as bandas observadas no espectro calculado, permite uma interpretação sobre a origem de interferências em nanopartículas para o efeito SERS e a consequente possibilidade de obtenção de bandas de menor largura, que permitam a obtenção de grandes intensificações para o lado anti-Stokes ou

Stokes. Porém, para melhor atribuir as bandas observadas no espectro, precisamos recorrer a um outro modelo que não seja o de apenas 2 osciladores acoplados. O aumento no número de osciladores acoplados acarretaria em um aumento na complexidade das equações, o que corresponde a um esforço desnecessário, já que a questão da interferência já foi explicada pelo modelo mais simples. Para a atribuição qualitativa destes modos no agregado de forma semelhante ao que foi feito com a Figura 61. Portanto, na Figura 67 apresentamos um modelo para as interações entre excitons para um sistema de 3 nanobastões.

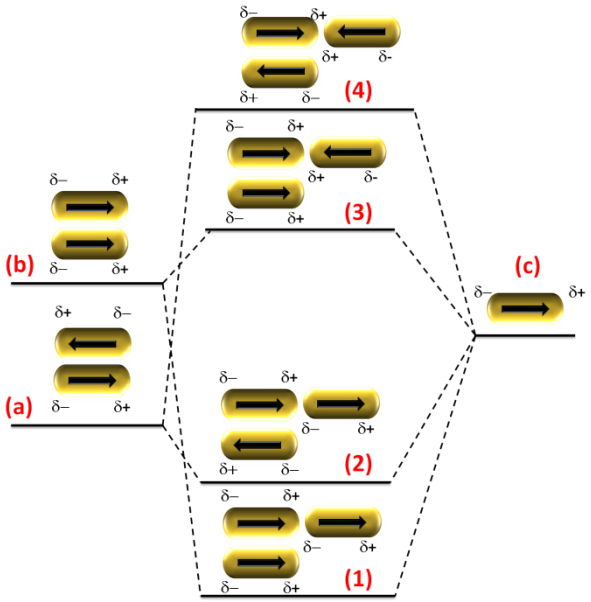


Figura 67: Diagrama esquemático para interação entre excitons no trímero de nanobastões esquematizado na Eq. 71.

O modelo considerado na Figura 67 é de acoplamento longitudinal entre os modos do dímero lateral (a, b) e do nanobastão individual (c), como indicado na figura. Este acoplamento é mais efetivo na situação indicada em (1), em que todos os dipolos induzidos nos nanobastões estão em fase no trímero, o que é obtido através do acoplamento em fase do modo em (b) com o modo em (c). Este acoplamento caracteriza a banda em *ca*. 900 nm no espectro simulado. Os demais modos apresentam nanobastões com momento de dipolo induzido fora de fase, como em (2), onde o nanobastão Nb 3 apresenta dipolo induzido fora de fase com os demais. As interações longitudinais fora de fase são as de maior energia e, portanto, em (3) e (4) são apresentados modos que foram construídos de forma semelhante a

(1) e (2), porém com interação fora de fase para o modo (c). Em (4) é apresentado um modo em que os dipolos induzidos em cada nanobastão estão todos fora de fase, situação que demanda maior energia para ser mantida.

As 3 bandas observas em *ca*. 700, 850 e 900 nm são, portanto, atribuídas aos modos (3), (2) e (1), respectivamente. O modo de maior energia no diagrama da Figura 67 pode não ser observado no espectro porque sua energia pode estar na região abaixo de 400 nm e/ou o momento de transição de dipolo é tão baixo que a banda não é visualizada no espectro. Nos modos (1) e (2) a interação longitudinal entre Nb 1 e Nb 2 ocorre em fase, enquanto que no modo (3) ocorre fora de fase, o que corresponde a uma interferência destrutiva no "*hot spot*", que pode justificar a assimetria para a banda em ~700 nm no perfil de intensificação do campo elétrico local. Para verificar as atribuições da Figura 67 foram calculados os fatores de intensificação $|g(\omega_0)|^4$ para cada um dos modos. Os resultados estão apresentados na Figura 68 (920 nm), Figura 69 (850 nm) e Figura 70 (700 nm).

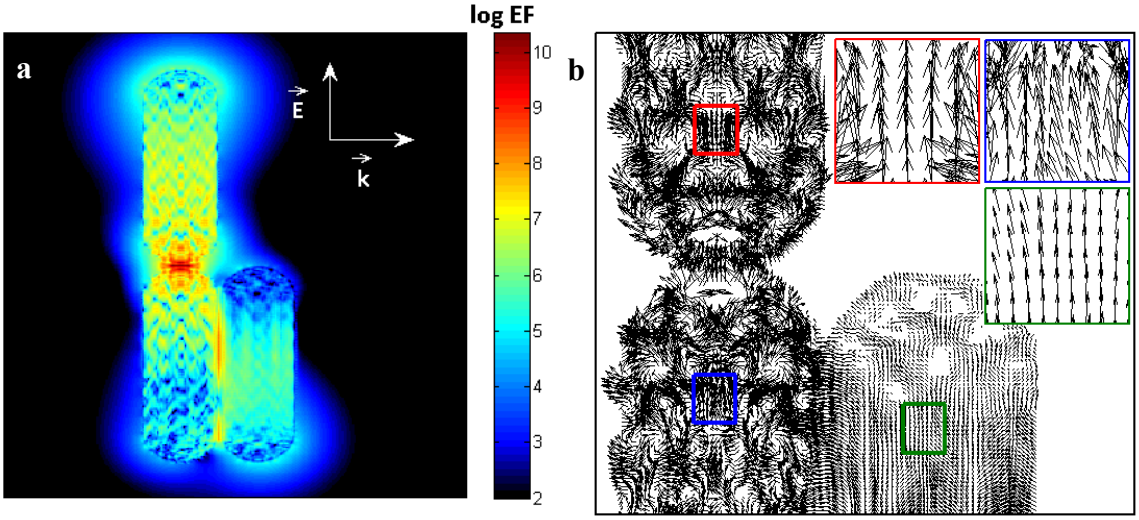


Figura 68: a) Mapa do fator de intensificação SERS ($EF_{EM} = |g(920\ nm)|^4$) para o agregado de 3 nanobastões. b) Vetores de campo elétrico no interior dos nanabastões. Os detalhes na figura correspondem a ampliações nas regiões demarcadas com os quadrados vermelho, azul e verde.

Na Figura 68a é apresentado o mapa dos fatores de intensificação para excitação em *ca*. 900 nm, onde se pode observar, além da alta intensificação no "*hot spot*", que as intensificações do campo elétrico no interior dos nanobastões não é a mesma, ou seja, nota-se campos mais intensos no interior dos nanobastões formando o "*hot spot*", o que é resultado do

acoplamento entre os dipolos induzidos nestes dois nanobastões. Na Figura 68b são apresentados vetores campo elétrico no interior dos nanobastões, onde se pode notar que a polarização do campo elétrico no interior dos nanobastões está de acordo com a atribuição (1) da Figura 67.

De forma semelhante, na Figura 69a são apresentados o mapa dos fatores de intensificação e vetores campo elétrico no interior dos nanobastões. Este modo de ressonância de plasmon de superfície, como no caso do modo (1) permite a formação de um "*hot spot*" com altos valores de intensificação do campo elétrico.

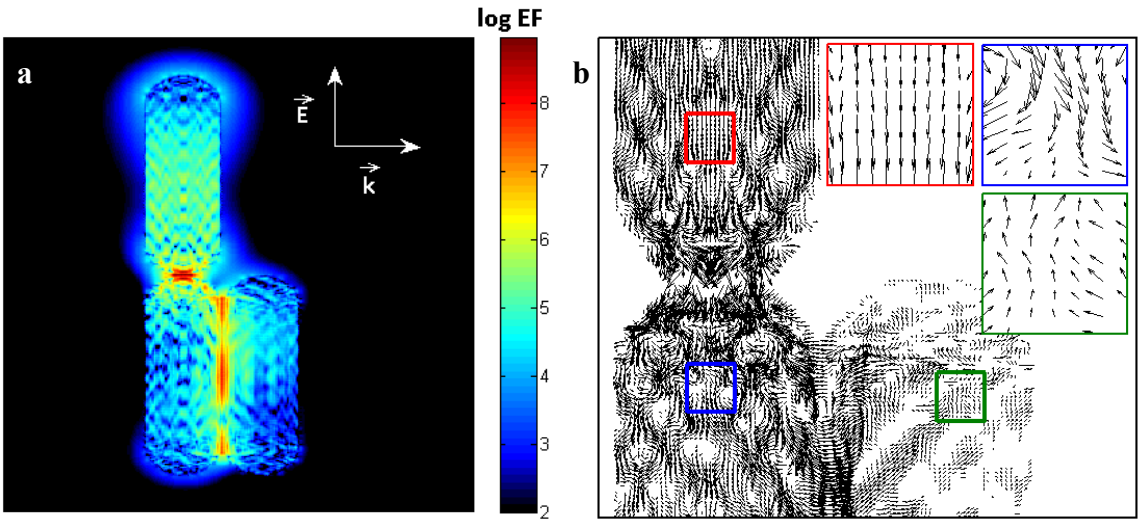


Figura 69: a) Mapa do fator de intensificação SERS ($EF_{EM} = |g(850\ nm)|^4$) para o agregado de 3 nanobastões. b) Vetores de campo elétrico no interior dos nanabastões. Os detalhes na figura correspondem a ampliações nas regiões demarcadas com os quadrados vermelho, azul e verde.

Na Figura 69b nota-se que os nanobastões Nb 1 e Nb 2 apresentam polarizações na mesma direção, ao passo que a polarização em Nb 3 é antiparalela, como pode ser observado nos detalhes da figura (ampliações). Estes resultados estão de acordo com a atribuição (2) da Figura 67.

Uma característica bastante interessante nos mapas dos fatores de intensificação é a região entre os nanotubos Nb 2 e Nb 3, onde se observa altas intensificações para o campo elétrico. Este resultado é contrário ao observado para os sistemas de maior simetria investigados acima, onde se observou diminuição do vetor campo elétrico em algumas regiões

entre dímeros laterais. A intensificação observada na Figura 69a pode ser entendida em termos da atribuição (2) efetuada para este modo de excitação. Pelo fato de que as polarizações entre Nb 2 e Nb 3 são antiparalelas, as cargas parciais geradas nas extremidade são contrárias entre os nanobastões, situação esta que permite a geração de um campo elétrico nesta região intermediária, justificando o resultado observado.

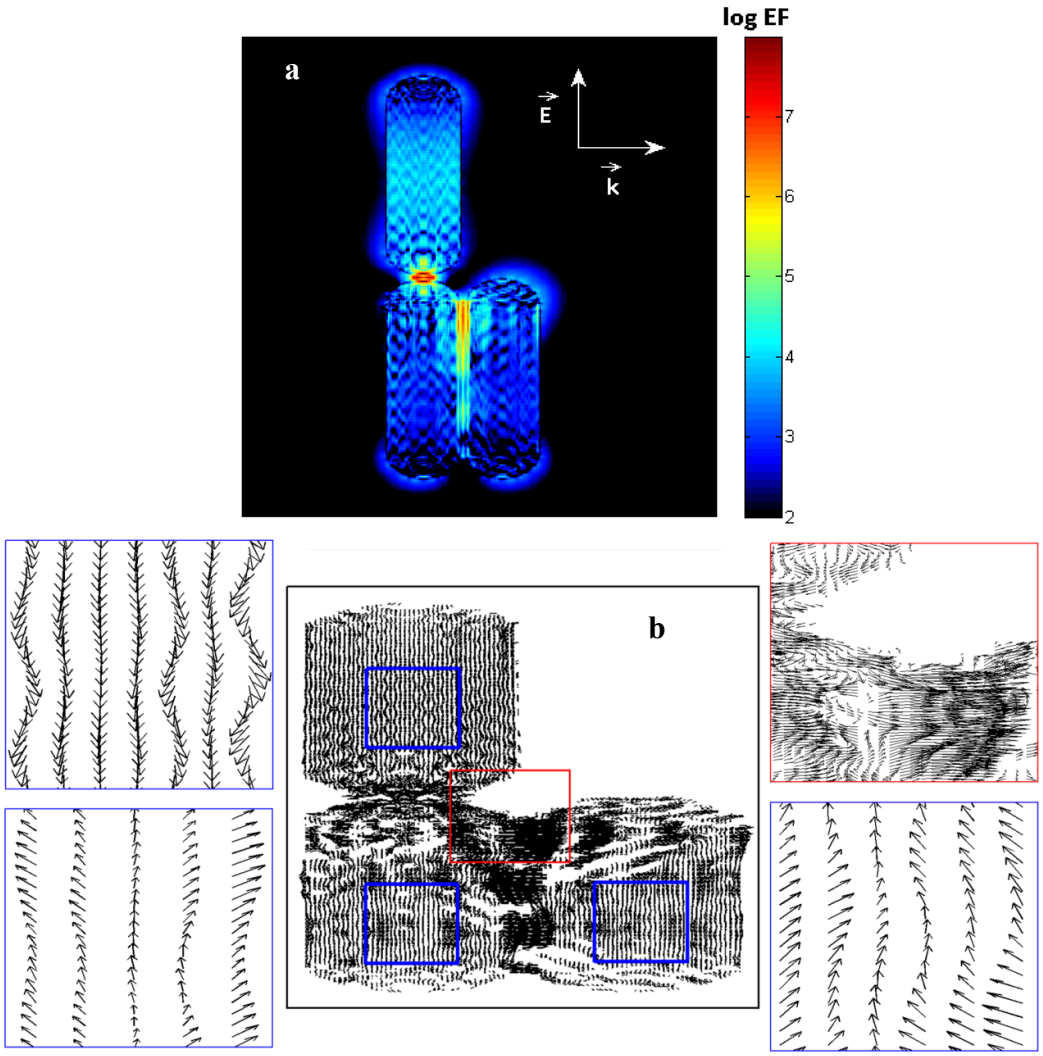


Figura 70: a) Mapa do fator de intensificação SERS (EFEM = $|g(700\ nm)|^4$) para o agregado de 3 nanobastões. b) Vetores de campo elétrico no interior dos nanabastões. Os detalhes na figura correspondem a ampliações nas regiões demarcadas com os quadrados vermelho e azul.

Por fim, podemos aplicar as mesmas análises para o modo corresponde a banda em ~700 nm, a qual apresenta uma ressonância do tipo Fano, sobretudo no espectro de espalhamento. Portanto, para investigar este modo, apresentamos na Figura 70 o mapa do fator de intensificação e os vetores campo elétrico no interior dos nanobastões para

comprimento onda de excitação corresponde ao mínimo no espectro de espalhamento (região de maior interferência no campo elétrico da radiação espalhada).

De forma semelhante ao exposto anteriormente, os vetores campo elétrico no interior dos nanobastões (Figura 70b) indicam polarizações que concordam com a atribuição (1) para o modo de excitação de plasmon de superfície. Observa-se na Figura 70b alta desorganização dos vetores campo elétrico no interior dos nanobastões Nb 2 e Nb 3, indicando alta contribuição de interferência, como esperado. Além disso, observa-se um significativo campo elétrico na região entre Nb 2 e Nb 3, que possivelmente se deve ao resultado da interferência entre os dipolos induzidos em Nb 1 e Nb 2.

4.4 – Conclusões parciais

Este capítulo teve por objetivo aplicar o método DDA para o estudo do ponto de vista teórico de resultados relacionados ao capítulo anterior. Um deles trata das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes em coloide de Ag. Os resultados indicaram relações de intensidade que sugerem a presença de "*hot spots*" formados por dímeros de nanoesferas separadas por distâncias entre 1 e 2 nm, como evidenciado pelas simulações DDA. Além disso, estas simulações permitiram interpretar o fato de que bandas em -1600 cm^{-1} podem ser observadas para este substrato com excitação laser em 785 nm, mas não para laser com comprimento de onda em 632,8 nm, o que está relacionado à presença de "*hot spots*" que apresentem ressonâncias no comprimento de onda da radiação excitante e espalhada. Apesar de não ser possível neste sistema simular as condições experimentais exatas quanto ao número e tipo de "*hot spots*", as simulações efetuadas permitiram, através de modelos, interpretar os resultados observados.

Em outro aspecto, foi investigada a possibilidade de obtenção de ressonâncias eletromagnéticas com largura de banda da ordem de 700 cm^{-1}, ou inferiores para explicação dos resultados experimentais. As simulações efetuadas para modelos de "*hot spots*" formados

por nanobastões mostram ser possível a obtenção de bandas com larguras tão baixas como estas através de interferência, o que foi evidenciado pela observação de bandas com considerável grau de assimetria nos espectros simulados pelo DDA. Estes resultados corroboram as interpretações de ressonância para a intensificação preferencial para os lados anti-Stokes e Stokes.

Capítulo 5

Considerações sobre as flutuações de intensidade SERS no regime de uma molécula

5. 1- Motivação

A obtenção de espectros de uma única molécula está diretamente associada aos "*hot spots*". Somente moléculas presentes em tais regiões de intensa amplificação do sinal Raman podem ser observadas de maneira única e exclusiva em condições de baixa concentração (da ordem de nM). Nestas condições de concentração, altas flutuações temporais (num mesmo ponto da superfície investigado pelo laser) e espaciais (diferentes regiões da superfície) podem ser observadas. [41-42] Estas flutuações contém tanto uma dinâmica de aparecimento e desaparecimento dos espectros (que pode ser observada até mesmo na escala de segundos, sendo que esta observação é usualmente chamada na literatura de "*blinking*" [37-39, 122-125]), quanto uma dinâmica de observação de deslocamento de frequências, variações de intensidades relativas de bandas ou mesmo alargamento das mesmas, que é resultado direto do fato de que esta molécula não se encontra isolada, mas interagindo diretamente com a superfície e com o solvente. [37-39, 125]

Uma variedade de mecanismos tem sido proposta para explicação de cada um destes fenômenos como: difusão térmica de moléculas para dentro e fora das regiões de maiores intensificações SERS, reorientações das espécies moleculares adsorvidas [123], processos fotoinduzidos (como alterações estruturais da superfície metálica [124]) ou mesmo fotoionização molecular via estados de transferência de carga [122], etc.

Na escala de tempo em que se observa o "*blinking*", o mecanismo difusional para dentro e fora do "*hot spot*" poderia ser invocado como uma possível explicação para as flutuações temporais, como as observadas nesta tese nos Capítulos 2 e 3. Para análise desta

contribuição é indispensável a consideração do tempo médio de interação entre a molécula e a superfície metálica, o que está associado à força desta interação e, consequentemente, à constante de adsorção. Neste contexto pretende-se investigar a contribuição da constante de adsorção para as flutuações temporais através de simulações do tipo Monte Carlo Cinético (KMC) para descrever a dinâmica estocástica das moléculas no solvente e na superfície das nanopartículas, sujeitas a uma configuração da distribuição de campo elétrico local calculado através de simulações DDA discutidas no capítulo anterior.

O método Monte Carlo Cinético corresponde a uma alternativa às simulações por dinâmica molecular para estudar processos dinâmicos. No caso da dinâmica molecular, as simulações são realizadas através da propagação no tempo das equações da mecânica clássica e, portanto, necessitam de uma boa descrição do potencial de interação entre os corpos que constituem o sistema, neste caso, as interações entre as moléculas que constituem o solvente e o soluto, além da interação entre estas e a nanopartícula metálica. Uma dificuldade desta abordagem no sistema investigado é a descrição dos potenciais de interação envolvendo as nanopartículas metálicas e, portanto, as simulações KMC oferecem uma alternativa para tal problemática, o que corresponde ao motivo para tal utilização neste capítulo.

Nas simulações KMC, ao invés de seguir a simulação ao longo de cada período vibracional, seguimos os eventos em que o sistema "foge" de uma determinada configuração energética através de transições, cujas probabilidades são descritas por meio de uma constante de velocidade. Por exemplo, no caso das simulações para descrever a dinâmica de interação entre moléculas e "*hot spots*", os resultados experimentais sugerem que a observação de espectros de uma molécula corresponde a um evento raro e, portanto, um conjunto muito grande de eventos em que a molécula não está no "*hot spot*" deve ser "ultrapassado" para a sua observação. Desta forma, ao invés de seguir cada um destes eventos, o que pode levar a um esforço computacional muito grande (e desnecessário) para atingir a escala de tempo do

"*blinking*" experimental, no KMC seguimos apenas o sistema escapando de um determinado estado para outro, por exemplo, através de difusão, adsorção ou desorção, o que ocorre com uma probabilidade de sucesso dada pela constante de velocidade do processo de escape. [126]

A probabilidade total de o sistema escapar em um determinado instante de tempo, t, de uma dada configuração será tanto maior quanto maior as constantes de velocidade dos processos de escape. Portanto, definimos esta probabilidade, p(t) como

$$p(t) = k_{tot} e^{-k_{tot} t}$$

Eq. 75

onde

$$k_{tot} = \sum_i k_i$$

Eq. 76

corresponde à soma das i constantes de velocidade dos processos de escape do sistema a partir de uma dada configuração e o valor médio (τ) da distribuição p(t), ou seja, o tempo médio de escape é dado por

$$\tau = \int_0^\infty t p(t) dt = \frac{1}{k_{tot}}$$

Eq. 77

As equações acima mostram que o tempo na simulação evolui de acordo com uma distribuição p(t) do tipo exponencial. Portanto, o incremento no tempo (t_{inc}) deve ser feito de maneira a obedecer tal lei de distribuição. A escolha é feita através da geração de um número aleatório, r, no intervalo (0,1), a partir do qual t_{inc} é dado por [126]:

$$t_{inc} = -\frac{1}{k_{tot}} \ln(r)$$

Eq. 78

Desta forma, podemos, através de tais simulações, seguir as flutuações de intensidade SERS no tempo para diferentes situações experimentais relacionadas ao que foi investigado

nesta tese, como por exemplo, a influência da constante de adsorção (Capítulo 2 e Capítulo 3), da concentração e do número de "*hot spots*" (Capítulo 2) para uma dada flutuação temporal de intensidade. Isto constitui o tema de investigação deste capítulo.

5.2 - Experimental e computacional

Espectros SERS na condição de uma molécula para R6G foram obtidos em coloide de Ag preparado pelo método de Lee e Meisel e as concentrações utilizadas foram de 10 nM da molécula. As demais condições experimentais quanto ao equipamento utilizado e potência da radiação excitante foram semelhantes às utilizadas para a obtenção dos resultados apresentados nos Capítulos 3 e 4.

Os algoritmos para as simulações Monte Carlo (MC) foram escritos no ambiente de programação estatística R. [36] Três tipos de simulação MC foram realizadas, porém todas baseadas no método KMC discutido acima. De fato, em duas dessas simulações foram utilizadas aproximações no método KMC, que serão discutidas no momento em que aparecerem no texto.

Todas as simulações MC se basearam em seguir a intensidade SERS no tempo para moléculas adsorvidas ou em regiões muito próximas à superfície de um modelo de "*hot spot*" constituído por dímeros de nanoesferas de Ag (ou Au) separadas por distâncias controladas (este modelo de "*hot spot*" foi explorado no Capítulo 4 do ponto de vista das ressonâncias eletromagnéticas). Estes "*hot spot*" foram primeiramente simulado através do DDA, a partir do qual o fator de intensificação $EF_{EM} = |g(\omega_0)|^4$ foi calculado para uma região (2D) em torno do dímero, simulando o fator de intensificação SERS (considerando somente o mecanismo eletromagnético) de moléculas presentes nestas regiões. A intensidade SERS foi, então, descrita como sendo proporcional a este fator de intensificação, onde foi aplicado um corte de 1.10^8, considerado como sendo o valor mínimo para o fator de intensificação para a observação do espectro SERS de uma única molécula. [127]. Desta forma, uma molécula em

uma região que experimenta um fator de intensificação SERS de 1.10^{10} proporcionaria, nesta simulação, uma intensidade SERS igual a 100 (unidade arbitrária).

Uma vez obtida a configuração (2D) do fator de intensificação ao redor do dímero, as simulações MC foram realizadas através da escolha de posições aleatórias para as moléculas nesta região. A partir desta configuração inicial das moléculas em torno do dímero, deixamos a simulação evoluir, permitindo que as moléculas escapem desta configuração inicial, por exemplo através de difusão, adsorção e/ou desorção, regidos por probabilidades de ocorrência, para as quais procurou-se utilizar parâmetros baseados em dados experimentais, como por exemplo o coeficiente de difusão utilizado foi o encontrado na literatura para a molécula R6G (Capítulo 2), ou valores para constantes de velocidade de adsorção e desorção de tal modo que a sua soma foi mantida constante em aproximadamente 1.10^4 s^{-1} (parâmetro ajustável), o que foi escolhido baseado nos dados para as flutuações de intensidade para a R6G.

5.3 - Resultados e discussão

5.3.1 - Influência da constante de adsorção nas flutuações de intensidade SERS no regime de uma molécula.

Para iniciar as simulações das flutuações de intensidade SERS, optamos primeiro por efetuar uma aproximação na simulação KMC, a qual se baseia nas simulações de Tsourkas e *col*. para descrever a cinética de formação de sinapses. [129-130] Estas simulações foram realizadas com a aproximação de que a probabilidade de adsorção é escolhida como um número arbitrário e constante, ou seja, que não se altera durante a dinâmica de adsorção e desorção e que não depende da cobertura de moléculas na superfície em um dado instante de tempo. Interpretamos como válida esta aproximação, pois se considerarmos que quando o regime de observação de uma molécula é atingido, a cobertura superficial é muito baixa e,

portanto, as pequenas variações no número de moléculas adsorvidas durante a dinâmica, não deve provocar variações significativas na cobertura superficial.

A principal ideia por traz desta simulação é, através de um modelo mais simples que o KMC, verificar, além do funcionamento do algoritmo escrito, a possibilidade de obtenção de informações importantes sobre o sistema com um custo computacional mais baixo, pois consideramos somente a constante de velocidade do processo de difusão.

Nossa simulação parte do princípio que 100 moléculas adsorvidas em um dímero de nanoesferas de Ag de 50 nm de diâmetro cada, corresponde a uma situação em que a condição de SERS de uma única molécula é satisfeita, ou seja, para esta concentração superficial é pouco provável que duas ou mais moléculas sejam observadas simultaneamente no "*hot spot*". Isto será discutido mais a frente, o que, como veremos, está de acordo com o exposto.

A região 2D em que se calculou $|g(\omega_0)|^4$ (onde $|g(\omega_0)|$ corresponde à intensificação do campo elétrico local) é de 120x120 nm^2, na qual o dímero de nanoesferas foi colocado na região central. Nesta região de simulação MC, 100 moléculas inicialmente não adsorvidas (não ligadas à superfície metálica) foram dispostas em posições aleatórias que consistem de "nós" separados por uma distância de 5 Å, considerado como distância suficiente para descrever o tamanho médio de moléculas tipicamente utilizadas para o estudo do efeito SERS, como as utilizadas nesta tese nos Capítulos 2, 3 e 4. A Figura 71 mostra uma configuração inicial gerada, de acordo com o exposto.

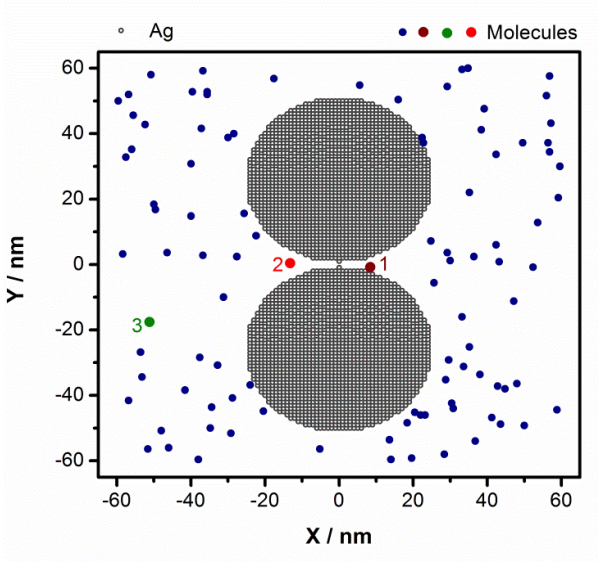


Figura 71: Configuração inicial gerada das moléculas em torno do dímero de Ag.

Uma vez que uma configuração inicial como a da Figura 71 é gerada, a simulação consiste em, aleatoriamente, selecionar cada uma destas moléculas e sortear um dos três movimentos: difusão, adsorção ou desorção. Este sorteio foi, nesta simulação, efetuado com o mesmo peso para cada uma das opções, o que corresponde a uma aproximação para a simulação, já que estes pesos são obtidos a partir das constantes de velocidade. Mais adiante, estas simulações serão realizadas sob este aspecto mais formal, incluindo as constantes de velocidade dos processos.

Se uma determinada molécula em uma determinada posição é sorteada para efetuar difusão, por exemplo, checa-se todas as 4 posições circundantes à mesma e as que não estejam ocupados por uma molécula podem ser sorteadas para receber a molécula em movimento, sendo que este movimento consiste de saltos entre as posições. Caso o movimento sorteado consista na adsorção, observa-se se há sítios de adsorção do metal vizinhos à posição da molécula e, em caso positivo, é efetuado sorteio do evento de adsorção de acordo com uma determinada probabilidade constante (p_{ad}), que irá definir a constante de adsorção. Da mesma maneira, uma molécula adsorvida pode sofrer desorção de acordo com uma probabilidade igual a 1-p_{ad} para que tal movimento ocorra. O correspondente estatístico para a constante de adsorção na simulação será:

$$Pa = \frac{p_{ad}}{1 - p_{ad}}$$

Eq. 79

A Figura 72 apresenta o esquema do método de simulação adaptado da referência [129].

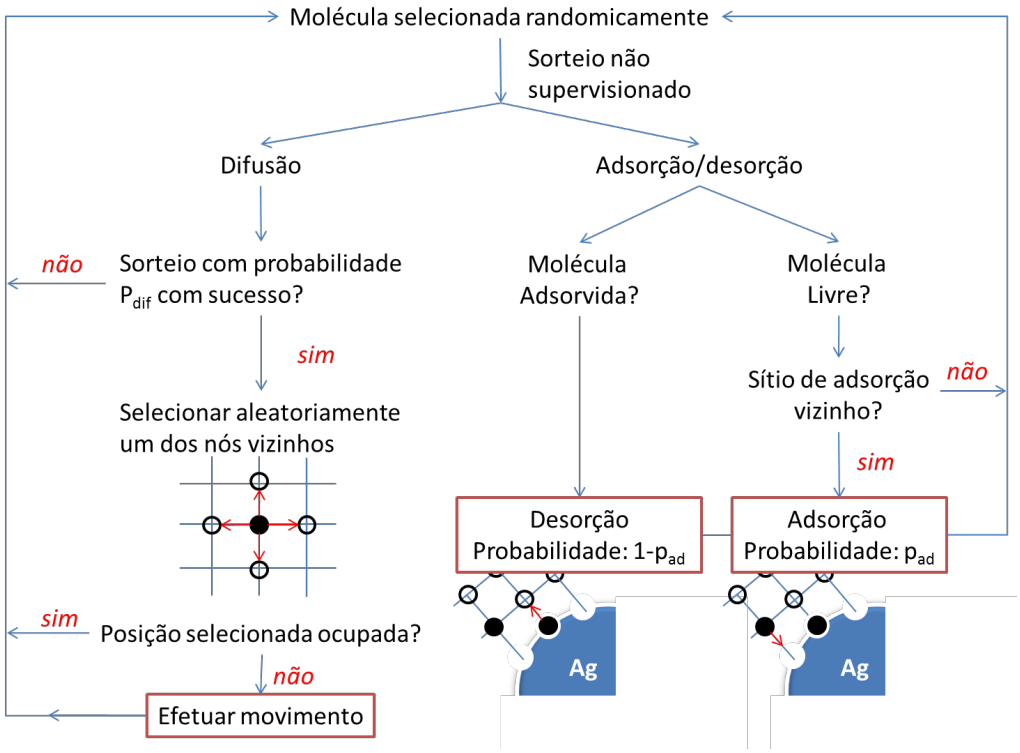


Figura 72: Algoritmo utilizado para a simulação MC do processo de difusão e adsorção molecular para análise das flutuações de intensidade.

Em cada etapa da simulação o procedimento descrito na Figura 72 é efetuado para *todas as moléculas* e a intensidade (proporcional ao fator de intensificação, EF) corresponde à soma das intensidades SERS correspondentes a cada uma das moléculas, neste caso 100. Para testar o algoritmo, uma simulação com 5000 etapas foi efetuada, com probabilidade de difusão (p_{dif}) igual a 1 e p_{ad} = 0, ou seja, desconsiderando em uma primeira instância efeitos de adsorção para testar somente o movimento difusional. Na Figura 73a são apresentadas as trajetórias monitoradas de 3 moléculas marcadas na Figura 71

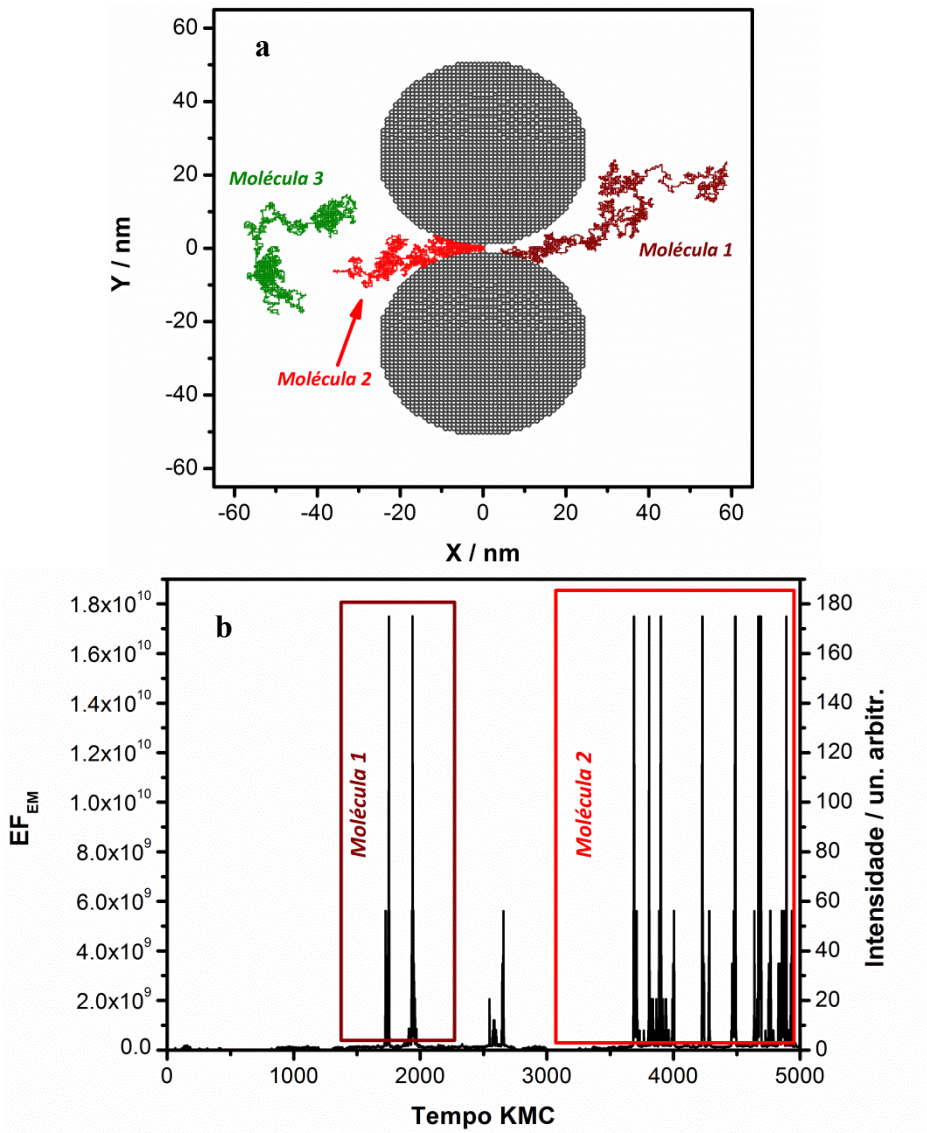


Figura 73: a) Trajetória de três moléculas selecionadas na Figura 71 para visualização do processo de difusão descrito pelo algoritmo. b) perfil da soma dos fatores de intensificação experimentados por cada uma das 100 moléculas. As intensidades SERS são proporcionais ao fator de intensificação e, portanto, a figura descreve o perfil de intensidades em função do número de etapas de simulação. Cada etapa da simulação corresponde a um tempo real, que podemos inserir no programa para esta simulação através do coeficiente de difusão da molécula que se deseja simular as flutuações de intensidade SERS.

As trajetórias da Figura 73a mostram que o algoritmo é capaz de descrever a difusão das moléculas utilizando argumentos simples de probabilidade. Analisando-se a figura, nota-se que as moléculas 1 e 2 entram e saem do "*hot spot*", enquanto que a molécula 3, durante os 5000 passos, não atinge esta região de intensificação do campo elétrico. Na Figura 73b são apresentadas as intensidades (EF_{EM}) em função das etapas de simulação, as quais correspondem a um tempo de simulação, que por ora chamaremos de Tempo KMC, o qual está relacionado a um tempo na escala de segundos.

Os sinais intensos na Figura 73b são originados quando as moléculas 1 e 2 entram no "*hot spot*", e desaparecem quando as moléculas saem destas regiões e, portanto, os sinais foram atribuídos na figura de acordo com a molécula responsável pelo mesmo. Este resultado está de acordo com a ideia de flutuação de intensidades devido à posição relativa das moléculas no "*hot spot*". A questão que se abre é a do tempo característico da simulação. Para responder a esta questão, na simulação acima, calculou-se o coeficiente de difusão médio, $\langle D_{sim} \rangle$, das moléculas na condição $p_{dif} = 1$:

$$\langle D_{sim} \rangle = \lim_{t_j \to \infty} \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \frac{(x_{ij} - x_0)^2 + (y_{ij} - y_0)^2}{(t_j - t_0)} \right)$$

Eq. 80

onde T = 5000 etapas de simulação, N = 100 moléculas, x_{ij}, y_{ij} são as posições (x,y) da molécula i na etapa da simulação $j \leq T$. Em cada etapa j, o coeficiente de difusão é calculado como uma média sobre o número de moléculas. Esta média corresponde ao termo entre parênteses na Eq. 80. A média no "tempo" é feita considerando todos estes valores gerados a cada etapa j e é indicado pelo símbolo < >. Na Figura 74a são apresentados os valores dos coeficientes de difusão para cada etapa j da simulação (aqui designado como *Tempo KMC*), bem como o valor de $\langle D_{sim} \rangle$ (linhas pontilhadas) para diferentes valores de p_{dif}.

Os resultados da Figura 74a mostram que é possível, através do algoritmo escrito, simular moléculas com diferentes coeficientes de difusão e/ou a dinâmica de moléculas em solventes mais ou menos viscosos. Isto pode ser feito controlando-se o valor de p_{dif} na simulação, o qual apresenta relação linear com o coeficiente de difusão (Figura 74b).

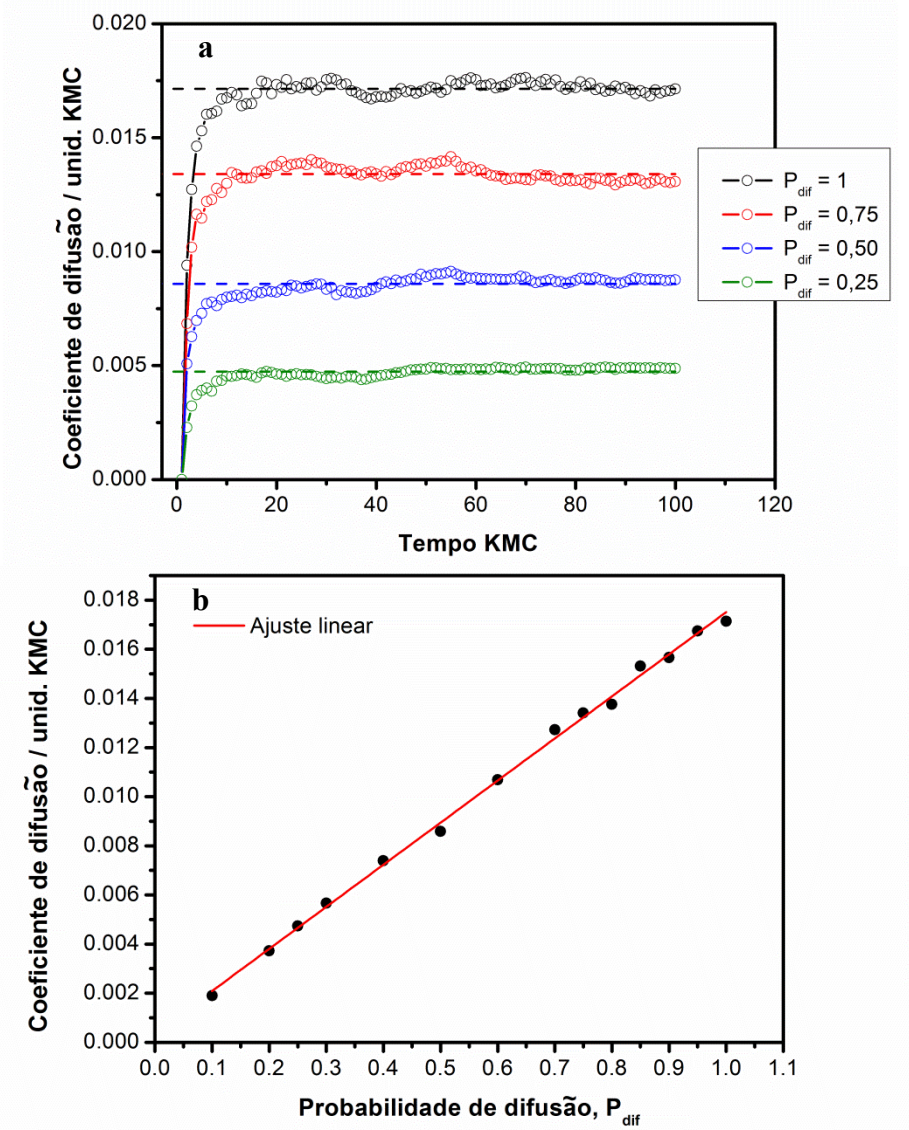


Figura 74: a) Valores da média sobre todas as moléculas do coeficiente de difusão em unidades KMC para diferentes probabilidades de difusão, p_{dif}. As linhas tracejadas representam o valor médio sobre o número de etapas de simulação (*Tempo KMC*). b) Relação entre o coeficiente de difusão médio e p_{dif}.

A partir dos dados da Figura 74, o valor de $\langle D_{sim} \rangle$ para $p_{dif} = 1$ é aproximadamente igual a:

0,17 (*espaçamento entre os nós*)^2.(*Tempo KMC*)$^{-1}$ x 0,25 (nm)^2.(nodal spacing)$^{-2}$ = 4,25.10^{-20} m^2.(*Tempo KMC*)$^{-1}$.

Se considerarmos uma molécula com o coeficiente de difusão da R6G (4.10^{-10} m^2.s^{-1} extraído da ref. 131), a escala de tempo de cada passo da simulação corresponderia a *ca.* **0,1 ns**, ou seja, ordens de grandeza inferior à observada experimentalmente. Portanto, do ponto de vista dos resultados experimentais, a difusão molecular sem a adsorção apresenta uma

flutuação a qual nós não temos acesso em nossos experimentos, uma vez que não temos resolução temporal para isto. Portanto, na simulação apresentada acima é necessário a inclusão da interação entre a molécula e a superfície, caracterizada pela constante de adsorção, inserida na simulação através do valor de p_{ad}.

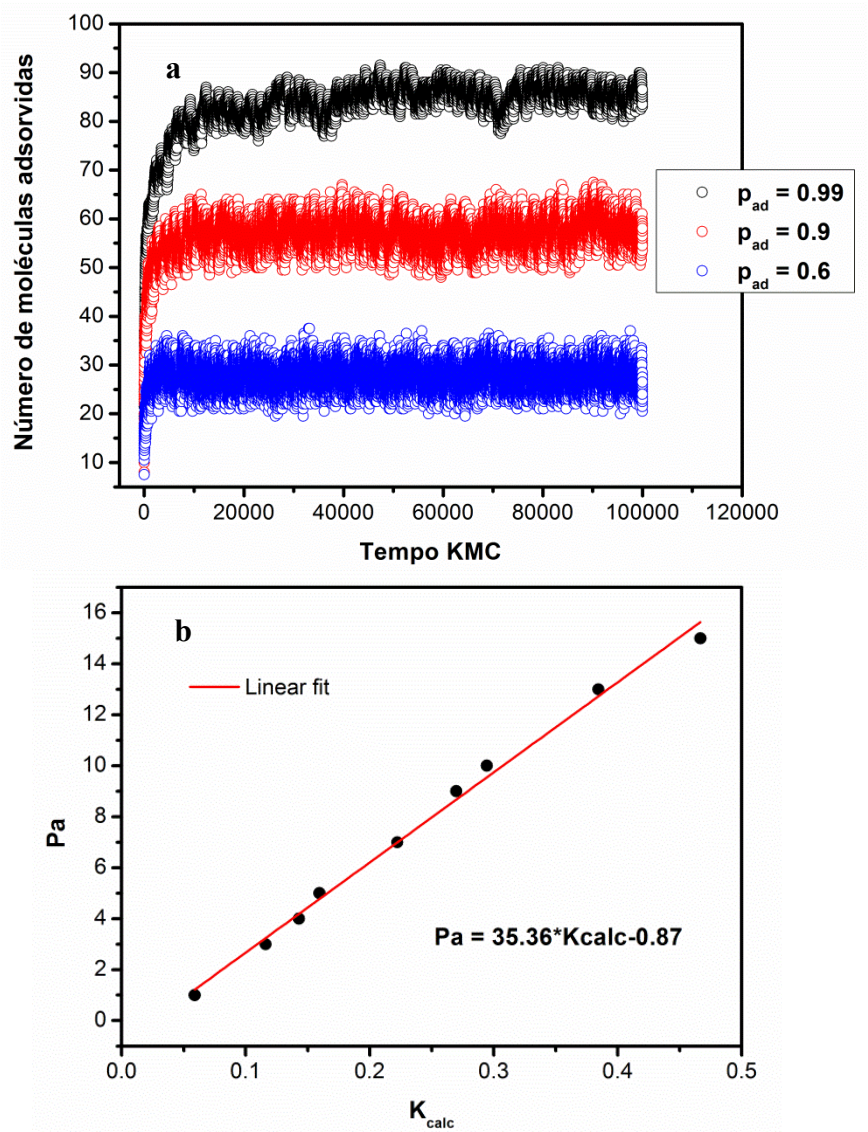


Figura 75: a) Dependência do número de moléculas adsorvidas com o número de etapas de simulação. b) dependência (linear) dos valores de Pa com a constante de equilíbrio calculada a partir dos dados em (a).

Na Figura 75a é apresentada a variação do número de moléculas adsorvidas em função do tempo de simulação para diferentes valores de p_{ad}, onde se nota um formato para as curvas muito semelhantes às obtidas para a cinética de adsorção. As curvas para diferentes valores de p_{ad} descrevem condições de equilíbrio, caracterizadas pela flutuação do número de moléculas adsorvidas em torno de um valor médio (patamar), que no caso das simulações apresentadas

correspondem aproximadamente a 86 ± 14 (p_{ad} = 0,99), 57 ± 19 (p_{ad} = 0,9) e 28 ± 18 (p_{ad} = 0,6).

Utilizando o número médio de moléculas adsorvidas, o valor da constante de equilíbrio na simulação foi calculado pela relação entre o número de moléculas adsorvidas e o produto do número de moléculas livres e de sítios de adsorção livres. Esta constante (K_{calc}), pode ser associada à constante de equilíbrio experimental que se deseja inserir na simulação, ou seja, para um determinado valor experimental de K existe um valor associado de Pa a ser inserido na simulação. A Figura 75b mostra que a relação entre Pa e K é linear. Se considerarmos o valor experimental para a constante de adsorção da R6G, 4.10^4 (referência [30]), o valor correspondente para Pa sugere (a partir do ajuste linear) que uma molécula adsorvida apresenta uma chance de se desorver de 1 em $1{,}4.10^6$ etapas da simulação, o que sugere, em média, a necessidade de um elevado número de etapas para que a desorção da molécula seja observada.

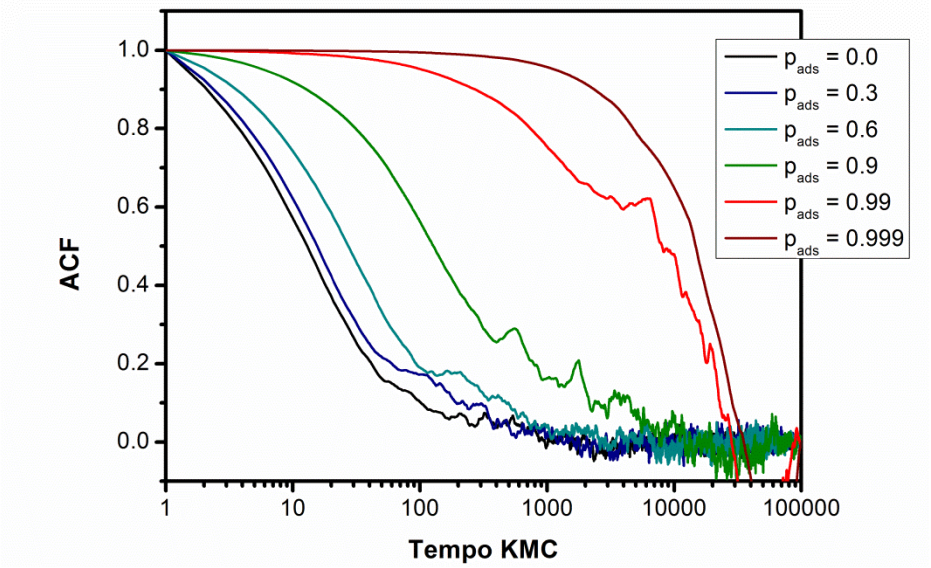


Figura 76: Funções de autocorrelação em função do tempo de simulação (Tempo KMC) para diferentes probabilidades de adsorção.

Para mostrar a influência da constante de adsorção no tempo característico das flutuações de intensidade, na Figura 76 são apresentadas as funções de autocorrelação (ACF)

no tempo para simulações com diferentes valores de p_{ad} como apresentado na figura. A função de autocorrelação foi calculada através de:

$$ACF(\tau) = \frac{\sum_{t=1}^{T} \left(EF_{EM}(t) - \langle EF_{EM}(t) \rangle\right) \cdot \left(EF_{EM}(t+\tau) - \langle EF_{EM}(t) \rangle\right)}{\sum_{t=1}^{T} \left(EF_{EM}(t) - \langle EF_{EM}(t) \rangle\right)^2}$$

Eq. 81

Na Eq. 81 $\langle EF_{EM}(t) \rangle$ corresponde ao valor médio de $EF_{EM}(t)$. A expressão corresponde à correlação entre os valores de EF_{EM} em um instante de tempo t e um intante de tempo seguinte t+τ. As funções de aucorrelação foram calculadas após o sistema atingir o equilíbrio de adsorção/desorção (Figura 75).

Como pode ser visualizado na Figura 76, quanto maior a constante de adsorção (quanto maior o valor de p_{ad}) maior o tempo necessário para que as flutuações de intensidade SERS percam completamente correlação. De fato, observa-se que o tempo característico da flutuação ao se passar de $p_{ad} = 0$ para $p_{ad} = 0{,}999$ é capaz de alterar o tempo de característico da flutuação em pelo menos 4 ordens de grandeza, mostrando que o tempo de interação entre a molécula e o metal (adsorção) é o que traz as flutuações para escala mais próxima de segundos.

Nestas simulações não é tão simples relacionar o *Tempo KMC* com o tempo real em segundos, uma vez que a adsorção e desorção não foram incluídas por meio das constantes de velocidade. No KMC a variação do tempo não é linear, mas muda de acordo com uma distribuição exponencial (Eq. 78) que está relacionada às rotas de escape do sistema a partir de uma determinada configuração. Por isso a necessidade de se incluir estas constantes de velocidade para se obter de forma clara o tempo característico da simulação.

Para melhor estudar estas flutuações de intensidade na presença de processos de adsorção e desorção, foram realizadas simulações KMC baseadas no que foi exposto na introdução deste capítulo, ou seja, utilizando as constantes de velocidade de adsorção e

desorção. Os resultados anteriores, apesar de sua simplicidade, nos permite efetuar uma nova aproximação para as simulações KMC a seguir: como os processos de difusão ocorrem em uma escala de tempo muito inferior à observada experimentalmente, estes não serão considerados a seguir. Desta forma, simulações KMC foram realizadas considerando-se

$$k_{tot} \approx k_{ad} + k_{des}$$

Eq. 82

onde k_{ad} e k_{des} são as constantes de velocidade dos processos de adsorção e desorção, respectivamente. De forma semelhante às simulações anteriores, para cada etapa do algoritmo é sorteado, para cada molécula, um evento entre adsorção e desorção de acordo com uma probabilidade p_{ad} e $p_{des} = 1\text{-}p_{ad}$, respectivamente:

$$p_{ad}(t) = \frac{w_{ad}(t)}{w_{ad}(t) + w_{des}(t)}$$

Eq. 83

onde

$$w_{ad}(t) = k_{ad}\left[N - N_{ad}(t)\right] \cdot \left[1 - \Gamma(t)\right]$$

Eq. 84

e

$$w_{des}(t) = k_{des}\Gamma(t)$$

Eq. 85

que correspondem a probabilidades de transição entre configurações pelos processos de adsorção e desorção. N e $N_{ad}(t)$ correspondem ao número total de moléculas utilizadas na simulação e o número de moléculas adsorvidas em um dado instante, t. Γ(t) é à cobertura superficial em um dado instante, definido como a razão entre o número de moléculas adsorvidas e o número total de sítios disponíveis para adsorção.

A cada passo da simulação os eventos de adsorção e desorção são simulados de acordo com as probabilidades p_{ad} e p_{des}, o que é seguido em cada etapa pela atualização dos valores de w_{ad} e w_{des} para novo cálculo de p_{ad} e p_{des}. Se uma determinada molécula é escolhida para se adsorver à superfície, um novo sorteio é, então, realizado para definir a posição na superfície para a adsorção, o que é feito através do sorteio de um ângulo θ (Figura 77) de acordo com uma probilidade p(θ) cuja distribuição[§§], de acordo com Le Ru e *col*. [43] é:

$$p(\theta) = \frac{1}{2}\sin(\theta)$$

Eq. 86

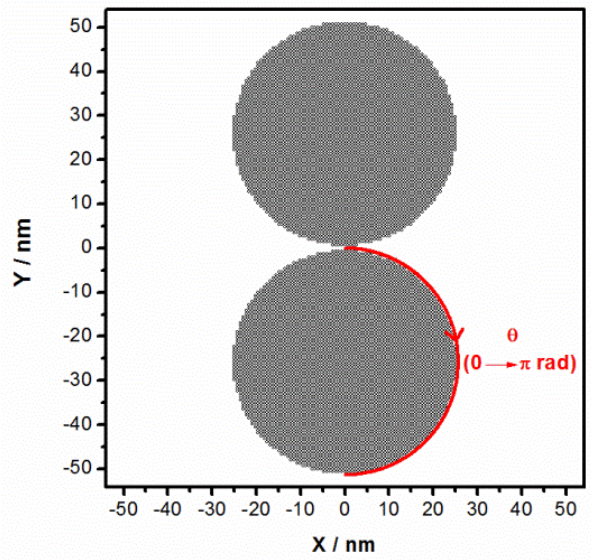


Figura 77: Representação da posição em torno do "*hot spot*" em função do ângulo θ.

Se o sítio escolhido através do valor de θ está vazio, então o processo de adsorção pode ocorrer, caso contrário passamos para a molécula seguinte. Após todas as moléculas passarem por estes processos de adsorção ou desorção, o tempo na simulação é atualizado de acordo com a Eq. 78.

[§§] Mais detalhes desta distribuição de probabilidade é apresentado na sessão 5.3.2, a seguir.

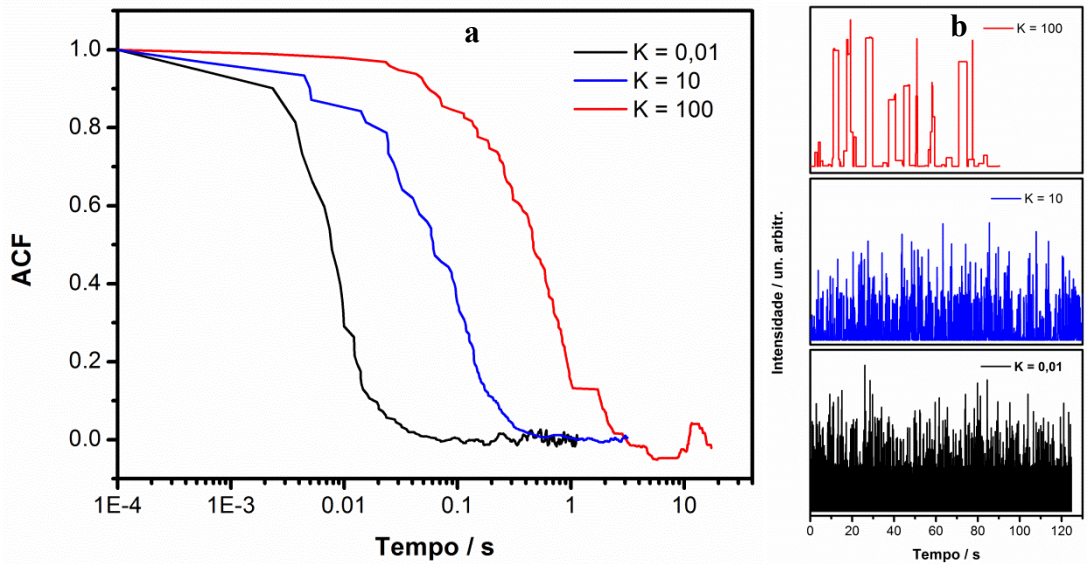


Figura 78: Funções de autocorrelação para diferentes valores de constante de adsorção, K (esquerda). À direita são apresentados os perfis de intensidade SERS com o tempo para cada valor K, que geraram as funções de autocorrelação.

Na Figura 78a apresentamos os resultados de ACF em função do tempo em segundos para diferentes valores de constantes de equilíbrio de adsorção (K), definidas pela razão entre as constantes de velocidade de adsorção e de desorção ($K = k_{ads}/k_{des}$). Vale frisar que as funções de correlação foram calculadas após o sistema atingir equilíbrio de adsorção/desorção. Podemos observar da figura que o aumento da constante de adsorção leva a observação de flutuações de intensidade em escala de segundos, o que está de acordo com os dados experimentais. Além disso, uma importante observação pode ser feita através da Figura 78b, que diz respeito ao aumento da constante de adsorção, ou seja, este aumento leva a uma diminuição das flutuações de intensidades na escala de tempo de segundos e o sinal eventualmente será mais constante nesta escala de tempo.

O que é interessante, e talvez não seja muito óbvio, é que o sinal SERS para valores mais baixos de constante de adsorção pode apresentar pequena flutuação de intensidade, ou seja, um sinal mais constante com o tempo dependendo do tempo de acumulação do sinal. Isto pode ser um contrassenso, pois esperamos que quanto menos moléculas adsorvidas por unidade de tempo, menor será a probabilidade de observação de um espectro SERS (maior a quantidade de eventos nulos). Porém se estivéssemos adquirindo espectro deste "*hot spot*"

para uma molécula com constante de adsorção K = 10 ou K = 0,01 em um experimento SERS típico, o tempo de aquisição dos espectros seria na escala de segundo (tempo típico de aquisição de espectros SERS no regime de uma molécula), o que corresponderia a uma integração dos sinais da Figura 78b para intervalos de 1 s. Como há um elevado número de eventos não-nulos neste intervalo de tempo, essa integração geraria uma distribuição de sinais com um número significativamente menor de eventos não-nulos como apresentado na Figura 79 (a, c). Porém, se as medidas forem realizadas com uma maior resolução temporal, por exemplo na escala de 1 ms, recupera-se a flutuação de intensidades com eventos nulos, tão característico do efeito SERS, como apresentado na Figura 79 (b, d). O motivo para tal observação pode estar relacionado ao fato de que se as moléculas se adsorvem fracamente à superfície, uma molécula fora do "*hot spot*" pode rapidamente se difundir para o mesmo, levando à observação do sinal SERS, enquanto que se ela interage fortemente com a superfície, será necessário um maior tempo para que ela seja desorvida e então se difunda até o "*hot spot*".

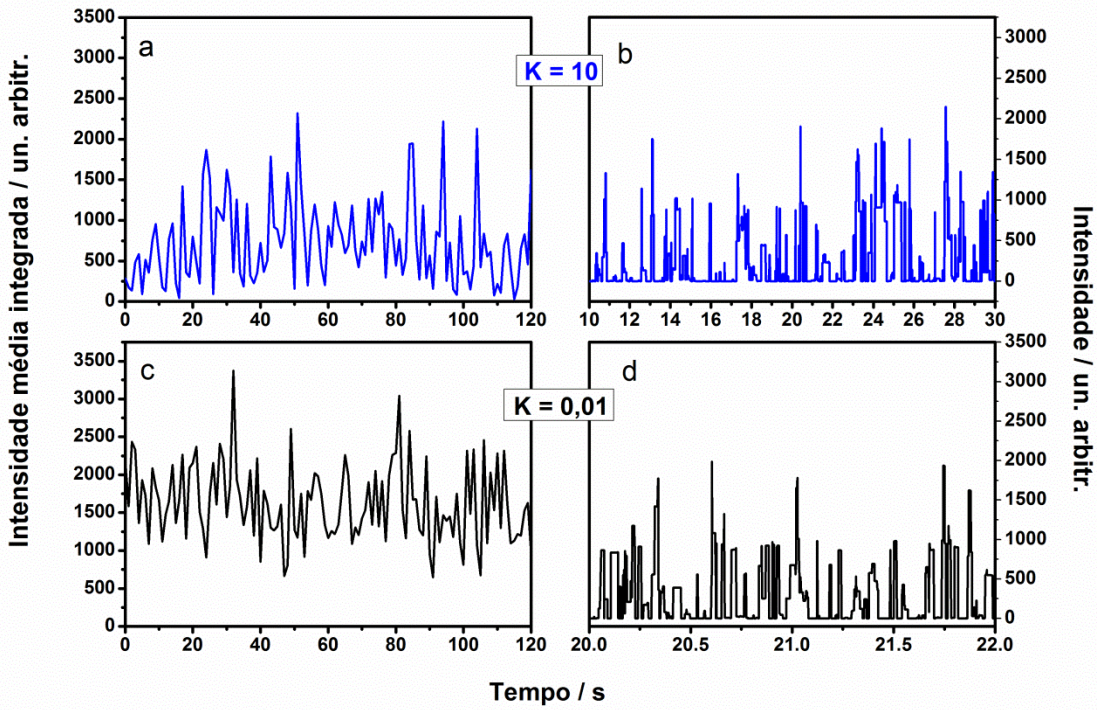


Figura 79: Em a) e b) são apresentados os perfis de intensidade SERS para constante de adsorção K = 10. Em a) são apresentados os valores de intensidade integrados em 1 s e em b) o perfil é apresentado na escala de tempo

da simulação KMC. Em c) e d) são apresentados resultados semelhantes a a) e b), porém com constante de adsorção K = 0,01.

Os "experimentos" da Figura 79a e Figura 79c, pela simples análise do perfil de intensidade SERS com o tempo (em uma integração de 1 s), poderia levar à falsa impressão de que o regime de flutuações não é característico de observação de uma única molécula, mesmo este sendo o caso, o que poderia ser observado através da diminuição do tempo de integração. Apenas para mostrar o efeito do tempo de aquisição nas flutuações de intensidade em função do tempo, apresentamos na Figura 80 resultados experimentais para R6G (10 nM) em coloide de Ag (Lee e Meisel [65]) utilizando-se radiação excitante em 632,8 nm. Na figura pode-se observar claramente que, com a diminuição do tempo de integração, eventos mais espaçados e isolados podem ser identificados, à semelhança da Figura 79.

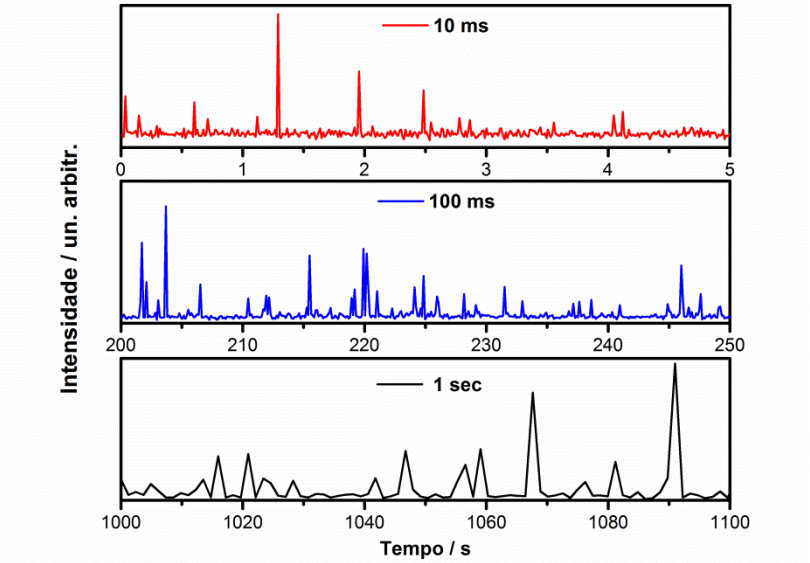


Figura 80: Perfis de intensidades SERS experimentais em função do tempo para R6G (10 nM) obtidos para o coloide de Ag sintetizado pelo método de Lee e Meisel. Os resultados são apresentados para diferentes tempos de integração, como indicado na figura.

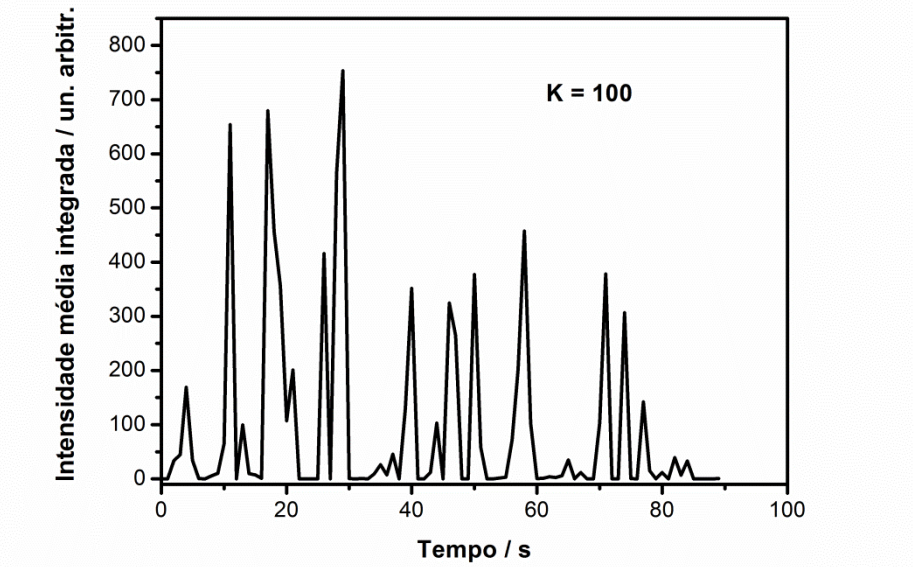


Figura 81: Perfil de intensidade SERS para o resultado da simulação KMC com K = 100 com tempo de integração de 1 s.

Para finalizar estas análises, apresentamos na Figura 81 o perfil de intensidades para K = 100, onde se observa uma grande correlação com o resultado experimental da Figura 80 (linha preta), o que mostra a eficácia de tal simulação para a análise temporal das flutuações de intensidade SERS no regime de uma molécula. Para esta constante de adsorção, os resultados não integrados apresentam, em alguns intervalos de tempo, valores constantes para a intensidade SERS, fato que dificilmente pode ser observado experimentalmente. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que experimentalmente os sinais coletados no tempo são, na realidade, originados de uma distribuição de (possivelmente diferentes) "*hot spots*". Portanto, esta observação mostra a necessidade da análise da influência do número de "*hot spots*" nas distribuições de intensidade.

Os resultados acima mostram a eficácia das simulações KMC para descrever os perfis de intensidade SERS no regime de uma molécula. Passamos agora a discutir os histogramas de distribuição de intensidades, os quais são normalmente as ferramentas mais utilizadas para o estudo SERS no regime de uma molécula e que foram amplamente utilizados nos Capítulos 2 e 3 desta tese.

5.3.2 - Estudo das distribuições de intensidade SERS: influência da concentração de moléculas, do número de "hot spots" e do tipo de "hot spot".

- Propriedades do modelo de "hot spots" quanto à distribuição de EF_{EM}

É aceito na literatura que fatores de intensificação SERS da ordem de 10^8 são suficientes para a observação de espectros de uma única molécula. Com esta característica em mente, na Figura 82 é apresentada a dependência dos fatores de intensificação eletromagnética em função do ângulo θ (definido na Figura 77).

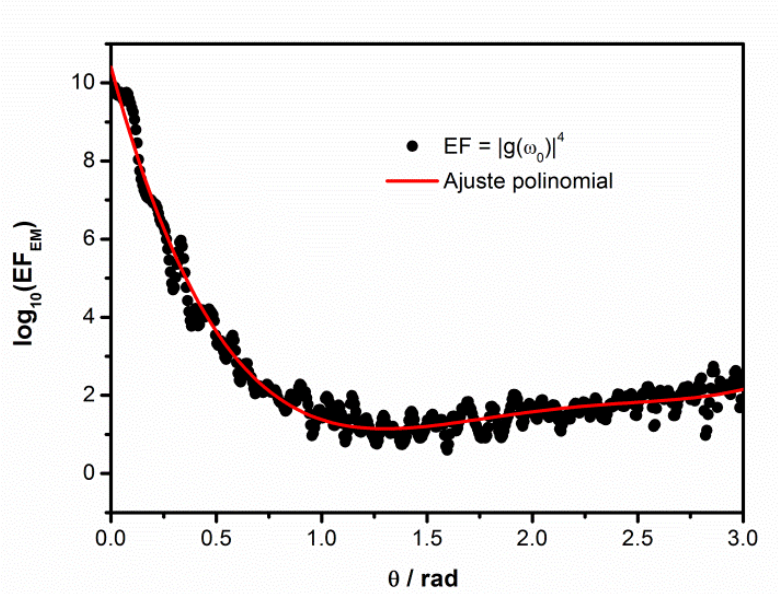


Figura 82: Variação do fator de intensificação eletromagnética em função do ângulo θ em relação ao centro do "*hot spot*".

Os fatores de intensificação eletromagnéticos (EF_{EM}) apresentam uma alta dependência com o ângulo θ, de tal forma que a região correspondente ao "*hot spot*", ou seja, região que permite observações de espectros de uma única molécula (fatores de intensificação $\geq 10^8$) é extremamente localizada em uma região de θ = ± 7,5º (~0,13 rad). Este resultado é bastante interessante, uma vez que mostra que uma molécula *adsorvida* em posições referentes a ângulos |θ| > 7,5º, os valores de EF_{EM} não são suficientes para observação de espectros desta molécula, ou seja, somente uma porcentagem de *ca.* 4% do dímero é responsável pelo sinal SERS observado nas flutuações de intensidade, de acordo com a interpretação utilizada no Capítulo 2 desta tese.

Esta alta concentração de campo em apenas 4% do dímero sugere que não é necessário a utilização de concentrações extremamente baixas para a observação de espectros de uma única molécula, como foi o caso, por exemplo, do eletrodo ativado Ag ORC utilizado como substrato SERS nos Capítulos 2 e 3.

Para investigar a dependência das flutuações de intensidade com a concentração, ou melhor, com o número de moléculas *adsorvidas*, efetuamos simulações MC para este dímero de acordo com o método de Le Ru e *col*. [43] Este método é baseado nas simulações KMC acima. Como estamos interessados em investigar a influência do número de moléculas adsorvidas, ao invés de simular a dinâmica de adsorção e desorção para diferentes números de moléculas, como foi feito acima, consideramos apenas a condição de equilíbrio, ou seja, um número médio constante de moléculas adsorvidas, cujas posições evoluem com as etapas de simulação.

As moléculas foram colocadas na superfície do dímero escolhendo-se posições aleatórias de acordo com uma distribuição de probabilidade dada pela Eq. 86. Na Figura 83 é apresentado um histogramas de valores de θ gerados por meio desta função de distribuição, onde se nota que há uma maior probabilidade de gerar ângulos com θ = 90º ($EF_{EM} << 1.10^8$). Portanto, a função de distribuição p(θ) conserva a característica de evento raro observado no SERS de uma molécula.

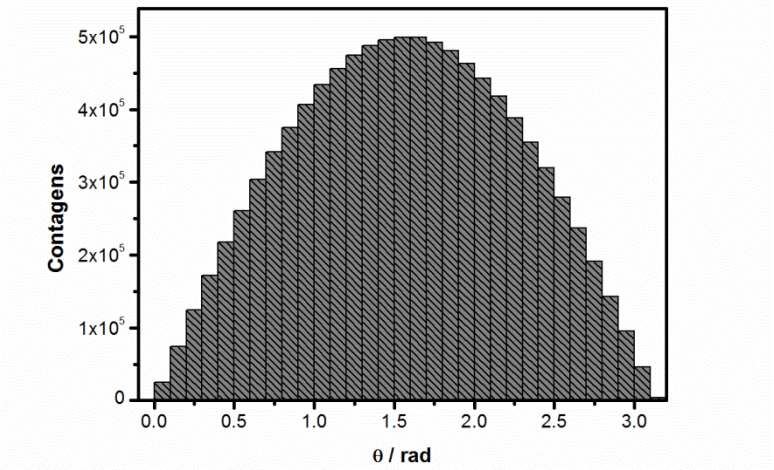


Figura 83: Histograma dos valores de θ de acordo com a probabilidade descrita pela Eq. 86.

Através da distribuição da Figura 83 é possível investigar, por exemplo, a distribuição de EF_{EM} neste "*hot spot*". Isto pode ser feito através da geração de centenas de milhares de ângulos como na Figura 83, o que, pelo uso do ajuste polinomial, Figura 82, permite a obtenção de um histograma da distribuição de $L = \log_{10}(EF_{EM})$. Através deste histograma geramos a curva de densidade de probabilidade para L, por meio da normalização da área do histograma, lembrando que:

$$\int_0^{\infty} p(L)dL = 1$$

Eq. 87

onde p(L)dL corresponde à probabilidade de se encontrar um $L = \log_{10}(EF_{EM})$ no intervalo infinitesimal dL. Na Figura 84 é apresentada a curva de distribuição de densidade de probabilidade p(L) obtida com este procedimento, onde se nota uma dependência linear para valores de L no intervalo 3-9, o que está de acordo com a distribuição de Pareto proposta por Le Ru e *col* [43], a qual é uma distribuição relacionada a eventos raros, como é o caso da observação de espectros SERS de uma molécula.

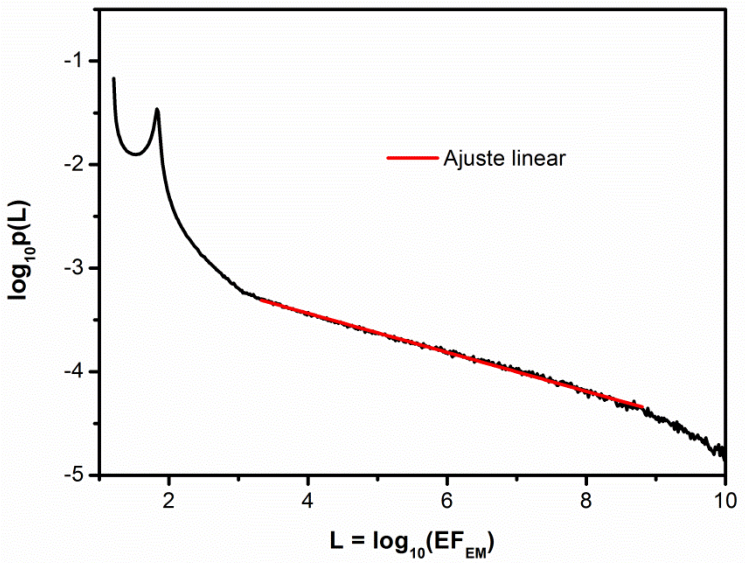


Figura 84: Perfil da densidade de probabilidade do fator de intensificação SERS no "*hot spot*".

Nota-se na Figura 84 que para valores de L no intervalo 9-10 a curva de distribuição se afasta ligeiramente da linearidade, o que pode ser devido ao método DDA utilizado para a simulação deste "*hot spot*", por causa de sua discretização em dipolos dispostos em um

retículo cúbico. Há uma limitação computacional no DDA quanto ao número máximo de dipolos a serem utilizados para a simulação, o que eventualmente não permitirá a descrição do "*hot spot*" com um número elevado de dipolos. Estes "*hot spots*", por corresponderem a regiões de grandes alterações da intensificação de campo elétrico, necessitam de uma descrição mais detalhada em termos de sua discretização. Outros métodos como o FEM ("*Finite Element Method*") que permite a descrição de determinadas regiões de forma mais detalhada que domínios da simulação poderia ser uma alternativa para melhorar a região de L entre 9 e 10. Porém, como o desvio da linearidade é baixo, isto não deve contribuir de maneira significativa nos resultados das simulações Monte Carlo, ou seja, os resultados podem muito bem ser utilizados para a interpretação qualitativa das influências da concentração, do número de "*hot spots*" e do tipo de "*hot spot*" nos histogramas de distribuição de intensidades, a seguir.

- Influência da concentração nos histogramas de distribuição de intensidade

Na Figura 85 são apresentados resultados de uma simulação MC para os histogramas de distribuição de intensidade para diferente número de moléculas adsorvidas em posições aleatórias na superfície do dímero simulado pelo DDA.

Para um dado instante de tempo, a intensidade SERS corresponde à soma das intensidades devido a cada uma das moléculas. Esta simulação foi efetuada com dois tipos de moléculas hipotéticas (mol1 e mol2) simultaneamente, as quais estão em mesma concentração superficial e apresentam as mesmas propriedades quanto à constante de adsorção e secção de choque Raman. Este procedimento consiste em uma simulação para o experimento "*bi-analyte*" com isotopólogos 49, ou seja, moléculas com as mesmas estruturas eletrônicas, propriedades frente à adsorção, secção de choque, etc., porém com frequências vibracionais ligeiramente deslocadas para alguns modos devido às diferenças isotópicas.

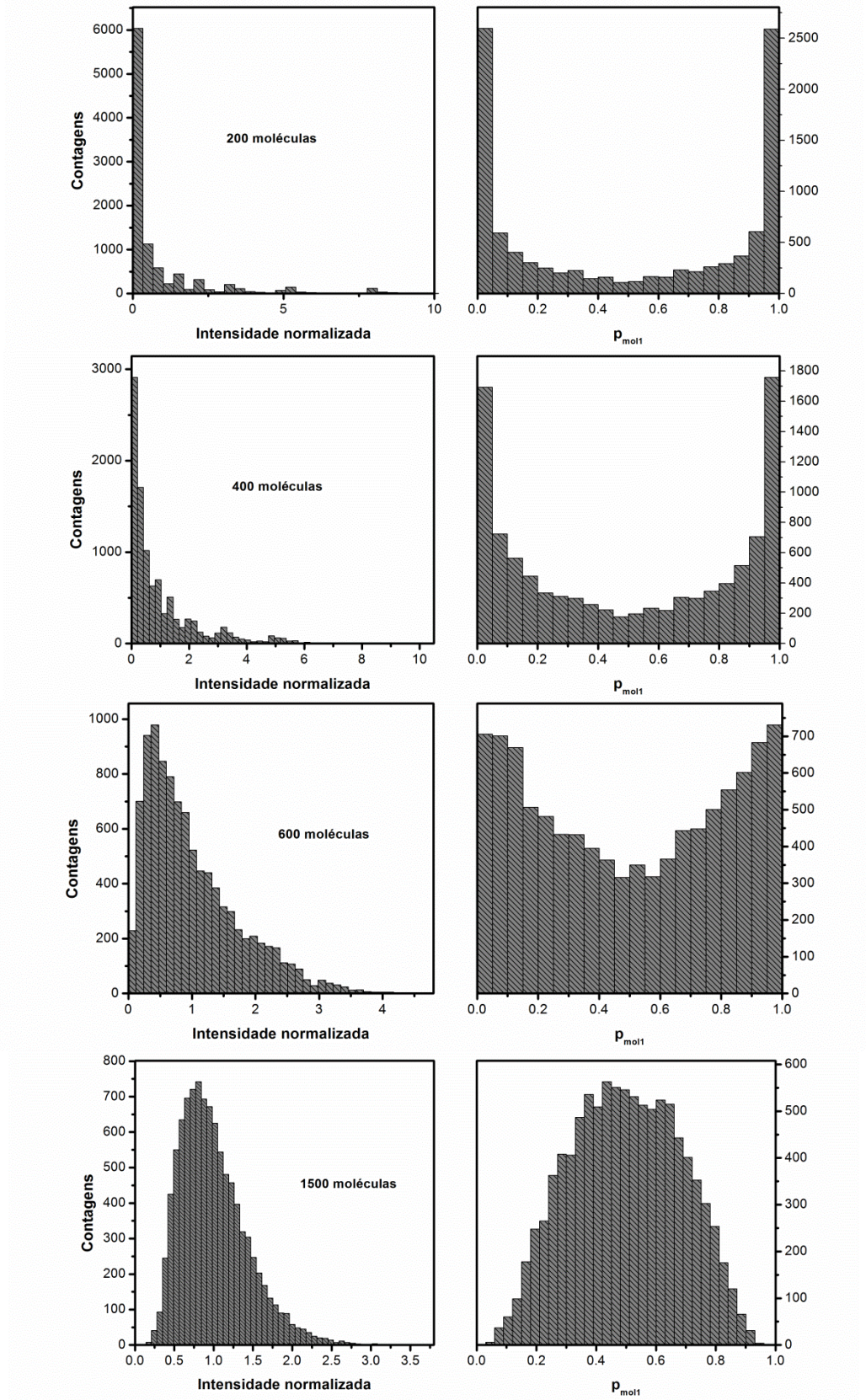


Figura 85: Em cada linha resultados de simulações Monte Carlo para diferentes números de moléculas adsorvidas. De cima para baixo: 200, 400, 600 e 1500 moléculas. Na primeira coluna são apresentados para cada concentração os histogramas de intensidades normalizadas. Na segunda coluna encontram-se os histogramas da porcentagem de sinal correspondente a um dos dois tipos de moléculas inseridas na simulação, por exemplo, *mol1*.

Cada uma das linhas da Figura 85 corresponde a uma simulação com diferente número de moléculas adsorvidas. De cima para baixo: 200, 400, 600 e 1500 moléculas distribuídas aleatoriamente na superfície em cada passo da simulação. Note que estas simulações apresentam somente os eventos de superfície, ou seja, não consideramos o efeito da difusão molecular do seio da solução para a superfície e consequente adsorção. Estas simulações têm como objetivo caracterizar este "*hot spot*" quanto à condição de cobertura superficial correspondente ao limite da separação entre a condição de observação de SERS de uma molécula e a de observação de SERS médio em função da cobertura superficial.

A coluna da esquerda na Figura 85 apresenta os histogramas de distribuição de intensidades normalizadas, onde se observa que, com o aumento do número de moléculas, a distribuição inicialmente do tipo exponencial (200 moléculas) com elevado número de eventos nulos, passa a uma distribuição do tipo lognormal (600 moléculas) com um número consideravelmente menor destes eventos, em que o valor mais provável da distribuição é mais próximo de 1, e então para uma distribuição normal (1500 moléculas) em que não são observados eventos nulos. Estes histogramas apresentam grande correlação com os apresentados no Capítulo 2 para os experimentos em diferentes concentrações.

Como discutido no Capítulo 2, o formato destes histogramas é comumente utilizado para a inferência do regime de observação de uma molécula, o que é baseado no conceito de "*blinking*" (observação de eventos nulos e não-nulos com o tempo). Os histogramas para 200 e 400 moléculas corresponderiam a regime de uma molécula, enquanto o histograma para 1500 moléculas (ausência de "*blinking*", ou eventos nulos) corresponderia ao regime de SERS médio. Para 600 moléculas, o histograma indica a presença de "*blinking*" (eventos de intensidade nula), porém com um caráter muito próximo ao de SERS médio (maior distribuição de eventos em torno de intensidade normalizada igual 1).

A coluna da direita mostra, para cada concentração de moléculas, a distribuição de p_{mol1} (cuja definição é a mesma que utilizada no Capítulo 2). Este tipo de distribuição é frequentemente utilizado como prova do regime de observação de espectros de uma única molécula, em que tal afirmação é proveniente de uma maior distribuição de espectros com $p_{mol1} = 1$ ou $p_{mol2} = 1$ em relação aos espectros em que as duas moléculas são observadas simultaneamente ($p_{mol1} = p_{mol2} = 0,5$). Espectros em que somente mol1 é observado são incluídos na coluna $p_{mol1} = 1$ (100% do sinal) e ao contrário, quando somente mol2 é observado, $p_{mol1} = 0$. Estes histogramas foram colocados na

Figura 85 ao lado de cada histograma de distribuição de intensidades para guiar a interpretação. Por exemplo, através destes histogramas notamos que para 200 e 400 moléculas a maioria dos eventos é correspondente à observação de uma única molécula ($p_{mol1} = 1$ ou $p_{mol2} = 1$). Para 600 moléculas observa-se um aumento significativo do número de eventos correspondentes à observação simultânea das duas moléculas. Para 1500 moléculas adsorvidas o histograma mostra que não há eventos correspondentes a uma única molécula, caracterizando a condição de SERS médio.

Os resultados dos histogramas de p_{mol1} mostram que a inferência do regime de observação de uma molécula acima, baseada na análise dos histogramas de distribuição de intensidades, é válida para este tipo de experimento, como é o caso do que foi exposto no Capítulo 2 desta tese, em que são comparadas diferentes condições de concentração para uma mesma molécula. Porém, em outras situações esta inferência pode levar a conclusões erradas. Um exemplo onde esta inferência pode provocar enganos é apresentado na Figura 86 utilizando resultados da simulação KMC da sessão anterior para K = 0,01 e K = 10.

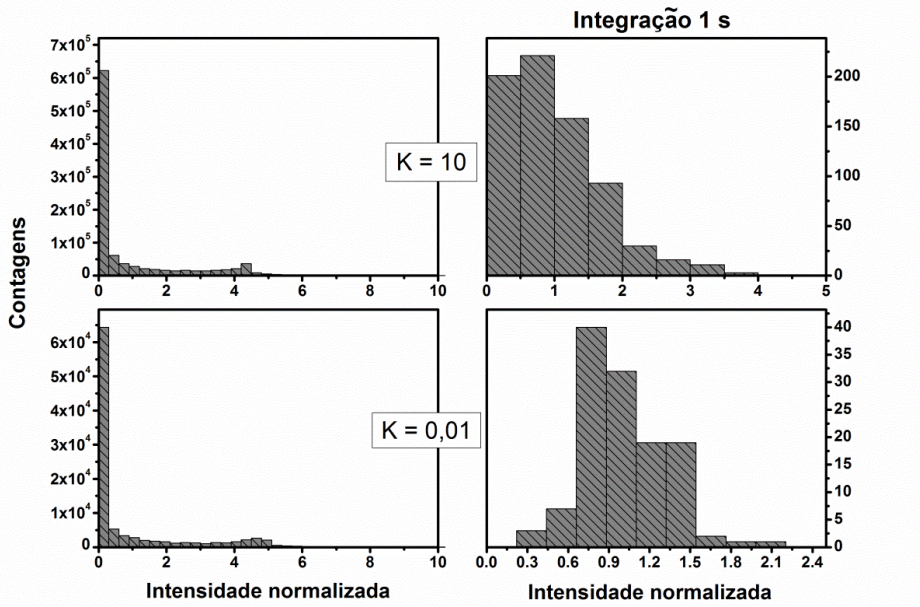


Figura 86: Histogramas de distribuição de intensidade para os perfis de intensidade da Figura 79.

Na coluna da esquerda na Figura 86 são apresentados os histogramas de distribuição das intensidades obtidas em cada passo da simulação para cada uma das constantes de adsorção indicadas na figura. Estes histogramas indicam que os eventos são de condição de observação de uma única molécula por revelar uma apreciável população de eventos nulos. Na coluna da direita são apresentados os histogramas das intensidades integradas (1 segundo de integração) para cada constante de adsorção. Para K =10 o histograma integrado é bastante diferente do histograma de intensidades não integradas. O número de eventos nulos é consideravelmente menor com a integração do sinal, mas a distribuição ainda apresenta um formato do tipo lognormal, com um considerável número de eventos de baixa intensidade, inclusive de eventos nulos, indicando ainda um regime de observação de uma única molécula. Para K = 0,01, porém, a distribuição das intensidades integradas apresenta um formato mais parecido com o perfil de SERS médio, o que levaria a interpretação de um regime de SERS médio, quando esta não corresponde à situação real.

Outro exemplo em que os histogramas de distribuição de intensidade podem ser muito distintos mesmo em condição de uma única molécula é apresentado na Figura 87 onde são

analisadas simulações MC para diferentes números de "*hot spot*", mantendo-se a densidade de 100 moléculas por "*hot spot*", o que será melhor discutido a seguir.

- *Influência do número de "hot spots" nos histogramas de distribuição de intensidade*

Experimentos reais são extremamente mais complicados do que o modelo simulado de um único "*hot spot*" formado por um dímero de distância fixa e controlada. Na realidade uma série de fatores contribuem para a dinâmica de flutuações, como por exemplo, o número e o tipo de "*hot spot*" provado em uma dada área iluminada pelo laser em um dado instante de tempo. Para um determinado substrato SERS, como o coloide de Ag preparado pelo método de Lee e Meisel [65, 132] e agregado com solução de KCl (ou KBr), por exemplo, os fatores de intensificação médios serão dependente do número de "*hot spots*" que contribuem para o sinal SERS. O eletrodo ativado por ciclos de oxidação e redução, por exemplo, é conhecido ser um substrato de menor eficiência SERS (menor fator de intensificação médio) que o coloide de Ag, mas, da mesma forma que este, possibilita a observação de espectros SERS de uma molécula (Capítulos 2 e 3). Uma interpretação para este fenômeno dada no Capítulo 2 é a menor distribuição no eletrodo Ag ORC, em relação ao coloide, de "*hot spots*" que apresentam ressonância na frequência da radiação laser.

Para evidenciar a importância do número de "*hot spots*" para as distribuições de intensidades SERS no regime de baixas concentrações (inferiores à cobertura de monocamada), foram realizadas simulações MC semelhantes às anteriores para maior número de dímeros conservando uma densidade de 100 moléculas por número de "*hot spots*". Para levar em consideração de que em um substrato desorganizado como estes os "*hot spots*" não necessariamente apresentam a mesma eficiência SERS, "*hot spots*" com diferentes eficiências foram simulados pelo DDA considerando 6 diferentes orientações do eixo interpartículas em relação à polarização do campo elétrico da radiação incidente: 0º (simulação discutida acima e no Capítulo 4), 15º, 30º, 45º, 60º e 75º, que está muito longe de ser uma situação semelhante

ao experimental, mas que corresponde a uma situação em que um dado sinal SERS pode ter maior ou menor contribuição de um determinado "*hot spot*".

As simulações MC consistiram em aleatoriamente sortear um número de "*hot spots*" dentre as possibilidades e para cada um dos sorteados posicionar na superfície do dímero 100 moléculas. Para cada passo da simulação uma nova configuração de "*hot spots*" é sorteada, bem como as posições das moléculas na superfície.

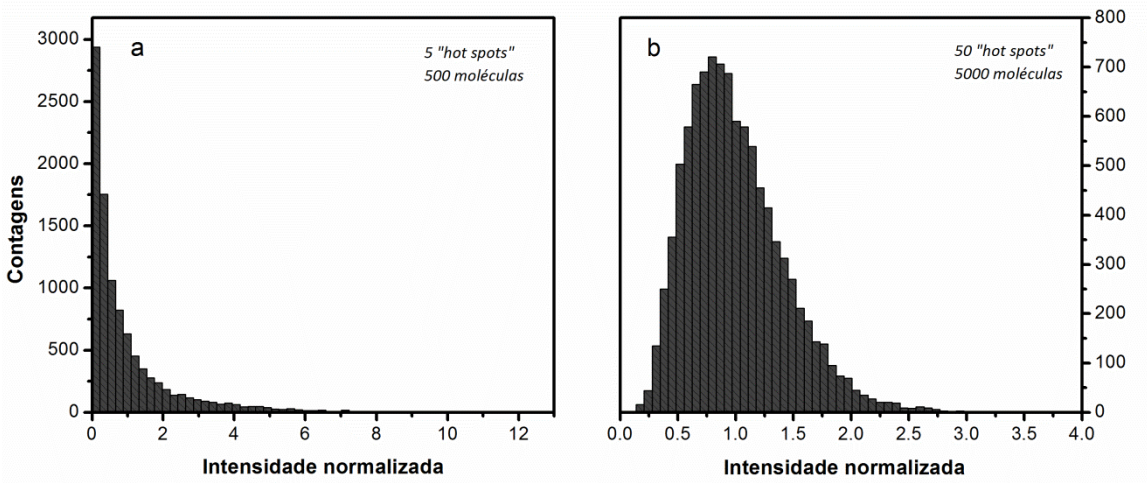


Figura 87: Histogramas de intensidade normalizada para diferente número de "*hot spots*" (como indicado), mantendo-se a densidade de 100 moléculas/ número de "*hot spots*".

Na Figura 87 são apresentadas as distribuições de intensidades para 10^4 passos de duas simulações, uma contendo 5 e outra 50 "*hot spots*". A diferença entre as distribuições de intensidade é evidente para as duas situações. Na primeira, a distribuição se assemelha ao caso particular de um "*hot spot*" tratado na Figura 85 com 400 moléculas, na qual a conclusão obtida foi de que as flutuações estão no regime de uma molécula. No histograma para 50 "*hot spots*", contudo, a distribuição se assemelha à esperada para um regime de SERS médio, por exemplo, o caso para 1500 moléculas da Figura 85.

Este resultado é bastante interessante, pois mesmo a quantidade de moléculas por número de "*hot spots*" sendo a mesma, se há uma maior distribuição de "*hot spots*" há uma maior probabilidade de que, em um dado instante de tempo, o sinal observado possa ser resultado da soma dos sinais gerados em diferentes regiões. Uma consequência para esta

situação é que para substratos diferentes, o que apresenta maior densidade de "*hot spots*" permitirá observação de flutuação de intensidades para concentrações cada vez mais baixas das soluções. Na literatura são vários os exemplos de limites de detecção abaixo de 1 nM para determinados substratos [41-42]. Uma consequência deste resultado é que substratos SERS com maior atividade apresentarão flutuações de intensidade correspondentes ao regime de observação de uma molécula para menores concentrações, enquanto que substratos com menor atividade SERS apresentarão tais flutuações para maiores concentrações de moléculas. Estes resultados justificam o fato de observarmos espectros SERS de uma molécula no eletrodo ativado para concentrações (10-20 nM) que não são tão baixas quanto às utilizadas na literatura, se considerarmos a interpretação de uma menor densidade de "*hot spots*" no eletrodo ativado ORC em relação a outros substratos SERS considerados de maior eficiência.

Na Figura 88 são apresentadas simulações em que se tentou manter a condição de SERS de uma única molécula para um sistema contendo 1 "*hot spot*" e o sistema com 50. Esta análise foi efetuada por comparação dos histogramas da distribuição de fração de sinal devido a mol1, em que foi alterado o número de moléculas para o sistema com 50 "*hot spots*" para que estes histogramas nas duas "concentrações" apresentassem formatos semelhantes.

Nota-se na figura que, quando os histogramas de distribuição de p_{mol1} para os dois casos apresentam aproximadamente o mesmo formato (~400 moléculas para 5 "*hot spots*"), o mesmo não pode ser dito sobre os histogramas de distribuição de intensidade (Figura 88a e c), os quais são consideravelmente diferentes, em que se nota uma maior população de eventos nulos para os resultados com 1 "*hot spot*" em relação ao histograma para 50 "*hot spots*". O histograma para 50 "*hot spots*" apresenta um número maior de eventos não-nulos, mostrando a maior eficácia deste substrato para o estudo de espectros SERS de uma molécula.

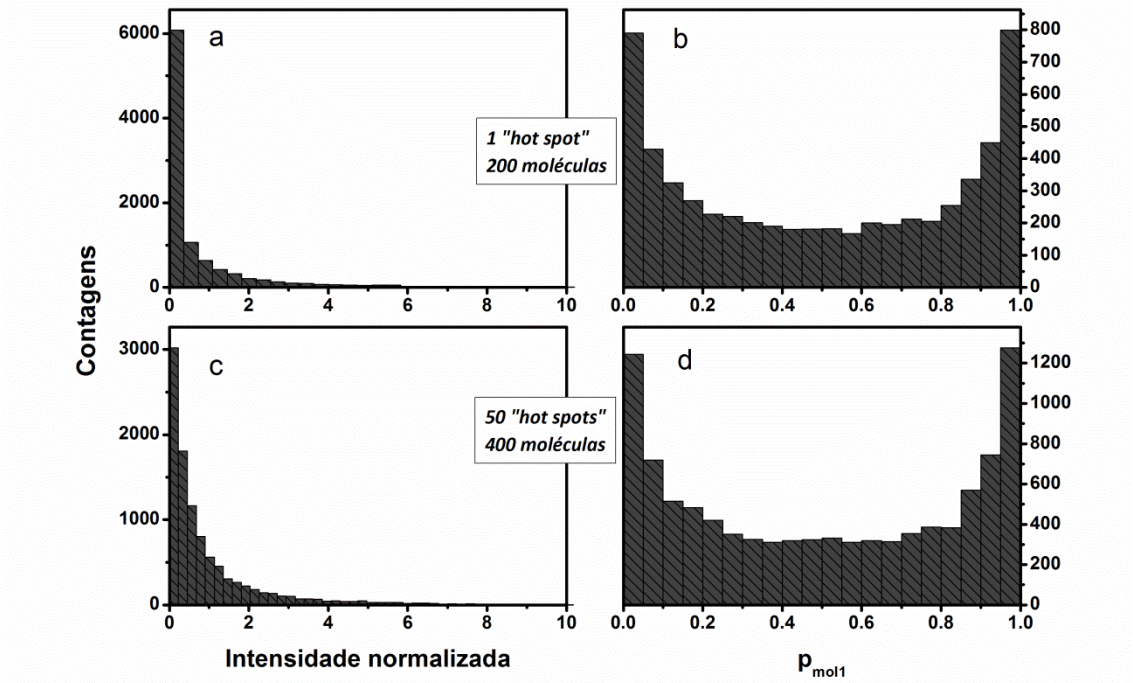


Figura 88: Comparação entre os histogramas de intensidade normalizada para um sistema contendo 1 "*hot spot*" (a) e outro contendo 50 (c), em que os regimes de flutuações foram controlados e ajustados para condições semelhantes através dos formatos dos histogramas de fração de sinal (b, d).

O mesmo procedimento foi realizado para diferentes números de "*hot spots*" visando manter o formato do histograma de distribuição de p_{mol1} como na Figura 88 (b e d). Os resultados do número médio de moléculas por "*hot spot*" em função do número médio de "*hot spots*" investigados são apresentados na Figura 89.

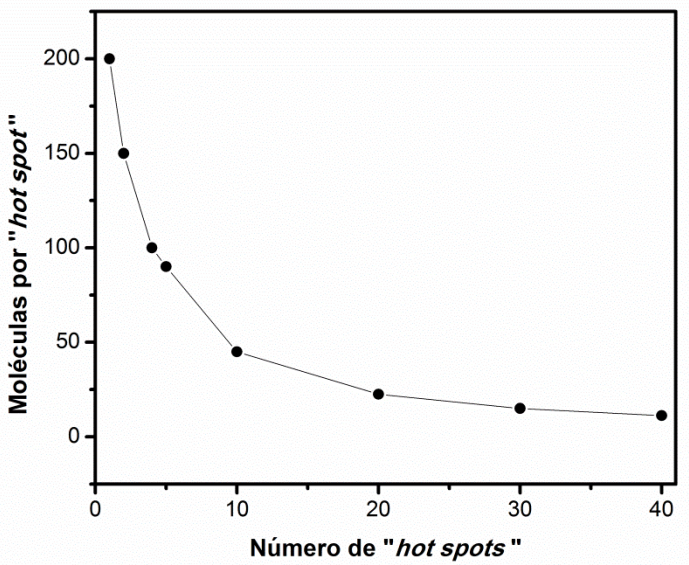


Figura 89: Dependência do número de moléculas por "*hot spot*" em função do número de "*hot spot*" para manter o formato do histograma de fração de sinal, p_{mol1}, semelhante aos da Figura 88 (c, d)

A Figura 89 corrobora a ideia de que um substrato com maior número de "*hot spots*" apresentará flutuação de intensidades ("*blinking*") para menores concentrações, devido a maior probabilidade em um dado instante de tempo de observação de espectros de moléculas em diferentes "*hot spots*". Esta característica justifica a interpretação de que as diferentes relações anti-Stokes/Stokes, dentro do modelo de ressonância, devem ser atribuídas a moléculas visitando diferentes "*hot spots*".

- *Influência do tipo de "hot spot"*

Para finalizar este capítulo sobre as flutuações de intensidade SERS e seus histogramas de distribuição investigamos a influência do tipo "*hot spot*" nas distribuições de intensidade. Por tipo de "*hot spot*" nos referimos às suas propriedades de intensificação e concentração de campo. Uma variedade de "*hot spots*" poderia ser utilizada para tal análise, como por exemplo, o agregado de esferas estudado no Capítulo 4 (Figura 57), ou mesmo os "*hot spots*" formados por nanobastões. Porém, para manter a simulação o mais simples possível sem perder sua validade, utilizamos um modelo de "*hot spots*" constituídos de nanoesferas (Au, raio 40 nm[***]) separadas por distâncias g = 1, 2 e 3 nm. Esta variação da distância entre as nanopartículas permite a formação de "*hot spots*" com diferentes propriedades frente à distribuição de EF_{EM}, tanto no aspecto do formato desta distribuição como no do valor máximo de EF_{EM} que pode ser obtido.

Na Figura 90 são apresentados os resultados das simulações MC para 100 moléculas adsorvidas nestes dímeros de nanopartículas. Em cada linha da figura são apresentados os histogramas de distribuição de intensidade normalizada (esquerda) e de p_{mol1} (direita). O valor fictício da potência da radiação laser na simulação para o "*hot spot*" com g = 3 foi multiplicado por 10, uma vez que os valores máximos do fator de intensificação são da ordem

[***] Neste caso foram estudadas do ponto de vista teórico nanoesferas de Au de 40 nm devido o interesse de se reproduzir os resultados do ponto de vista experimental, o que requer controle sobre o tamanho das nanopartículas sintetizadas e estabilidade das mesmas, o que pode ser mais facilmente obtido com nanoesferas de Au do que de Ag.

de 10^{7-8}, o que corresponderia experimentalmente a uma difícil visualização do sinal SERS, isso se o mesmo não estivesse sobreposto pelo ruído do equipamento. Isto foi feito através da multiplicação dos valores EF_{EM} por 10 em toda a superfície do dímero.

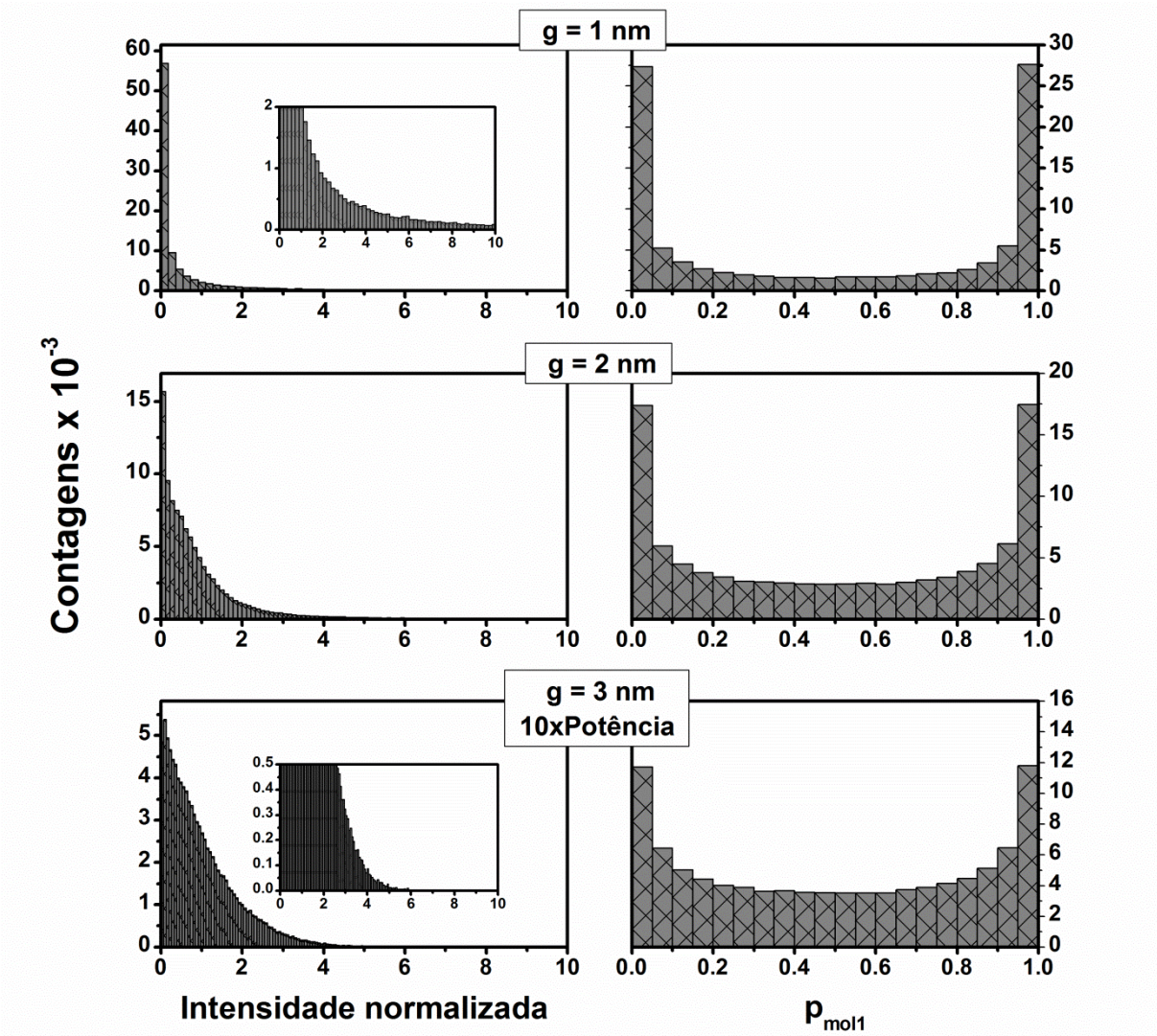


Figura 90: Em cada linha resultados de simulações Monte Carlo para diferentes "*hot spots*". De cima para baixo "*hot spots*" formados por dímeros de nanoesferas de Au de 40 nm de diâmetro separadas por distâncias ("*gap*"): g =1, 2 e 3 nm. Em cada simulação foram utilizadas 100 moléculas adsorvidas em posições aleatórias da superfície das nanoesferas. O valor máximo do fator de intensificação no "*hot spot*" com distância 3 nm foi multiplicado por 10, simulando um aumento na potência da radiação laser por 10 vezes.

O formato dos histogramas de distribuição de intensidade claramente depende de g, ou seja, as distribuições de intensidade dependem do tipo de "*hot spot*", como esperado. Agora, um fato bastante interessante que se pode observar nestes histogramas é como se dá a alteração da largura nestes histogramas: o efeito do aumento g é bastante semelhante ao efeito do aumento de concentração para um único "*hot spot*", discutido acima, ou seja, os

histogramas de distribuição de intensidade passam de um formato exponencial e começam a adquirir características de uma distribuição lognormal, com uma menor variação na extensão dos valores de intensidade normalizada (eixo x nos histogramas). Além disso, apesar dos histogramas de p_{mol1} descreverem essencialmente uma condição de observação de uma molécula, com o aumento de g observa-se um pequeno, mas observável, aumento na proporção de eventos com p_{mol1} = 0,5 em relação à p_{mol1} = 1 ou 0, o que mostra que nos substratos com maior valor para g, há uma maior chance de observação de eventos que não são de uma única molécula, o que, neste caso especial, pode estar relacionado ao volume dos "*hot spots*" (região com EF ≥ 10^8), como apresentado nas imagens do fator de intensificação SERS (EF_{EM}) para cada um destes substratos na Figura 91.

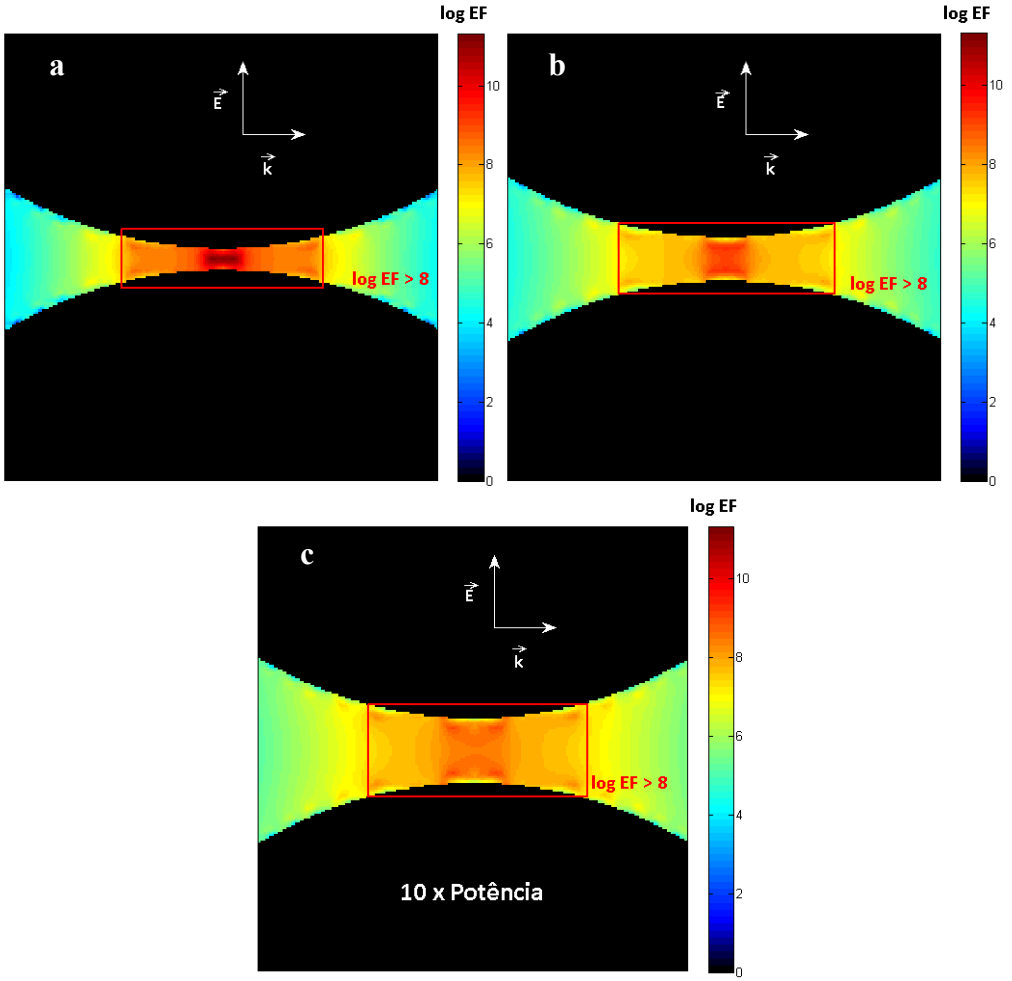


Figura 91: Mapas dos fatores de intensificação SERS para os "*hot spots*" com separações g = 1 nm (a), 2 nm (b) e 3 nm (c).

As imagens da Figura 91 mostram que o aumento da distância entre as nanopartículas provoca um aumento do volume dos "*hot spots*" e, portanto, uma menor concentração do fator de intensificação. É possivelmente este aumento no volume do "*hot spot*" que provoca o aumento da distribuição de eventos que não são de uma molécula ($p_{mol1} \neq 0$ e $p_{mol1} \neq 1$).

5.4 - Conclusões Parciais

Este capítulo teve como propósito apresentar algumas contribuições para a dinâmica de flutuações temporais de intensidade observadas em experimentos SERS no regime de uma molécula. Neste contexto, mostramos através do uso coordenado de simulações DDA e Monte Carlo (baseadas no método Monte Carlo Cinético) a importância da constante de adsorção, não apenas no formato das distribuições de intensidades, mas também na escala de tempo dessas flutuações. Outros parâmetros investigados, como a concentração, quantidade e tipo de "*hot spots*" presentes em um determinado substrato SERS, juntamente com a constante de adsorção, indicam que apenas a análise dos histrogramas ou do perfil de intensidades obtidos em um experimento SERS com um dado tempo de integração pode levar a interpretações errôneas sobre a condição de observação ou não de espectros de uma única molécula.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas

Nesta tese apresentamos resultados sobre o efeito SERS no regime de detecção de uma molécula em eletrodo de Ag ativado por ciclos de oxidação e redução. Foi mostrado que este eletrodo apresenta a eficiência necessária para a detecção de espectros neste nível de detecção, mesmo o eletrodo de Ag ativado sendo um substrato de menor eficiência SERS médio que outros substratos, como o caso de nanopartículas coloidais. Os resultados foram interpretados como sendo devido a uma menor distribuição de "*hot spots*" no eletrodo com ressonância no comprimento de onda da radiação laser (632,8 nm). Isto permite a observação de flutuações de intensidade características de detecção de uma única molécula para concentrações em solução maiores do que as concentrações em que estas flutuações são observadas em substratos de maior eficiência SERS. Estes resultados foram confirmados através de simulações Monte Carlo, onde se observou uma dependência da concentração em que tais flutuações são observadas em função do número de "*hot spots*". Além disso, as simulações Monte Carlo permitiram verificar a dependência de outros fatores nas distribuições de intensidade, como da constante de adsorção, que foi interpretado como um elemento essencial para o entendimento da escala de tempo em que estas flutuações são observadas (da ordem de 1 ms a 1 s).

Os resultados apresentados nesta tese mostram uma vantagem muito importante na utilização do eletrodo ativado para o estudo das flutuações de intensidade em relação a outros substratos, que corresponde à possibilidade do estudo da influência do potencial aplicado ao eletrodo. Neste caso, observaram-se alterações nos histogramas de distribuição de intensidade com o potencial aplicado, que indicaram alterações na concentração superficial de moléculas adsorvidas com o potencial.

A influência deste potencial aplicado não se restringiu às flutuações de intensidades absolutas, mas também foram observadas alterações nas flutuações de intensidades relativas. Neste caso foram estudadas flutuações das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes, as quais foram interpretadas como sendo originadas de contribuições ressonantes nos lados anti-Stokes ou Stokes. Neste caso um espectro em que o lado anti-Stokes apresenta-se intensificado em relação ao Stokes se comparado ao Raman normal pode ser interpretado como sendo originado de um "*hot spot*" onde a ressonância (EM + CE) está do lado anti-Stokes. O contrário vale para o caso de intensificações do lado Stokes. A aplicação de potencial ao eletrodo levou, além de alterações nas concentrações de moléculas na superfície, modificações na condição de ressonância CE, através da alteração do nível de Fermi no metal. A consideração do efeito CE nos experimentos no regime de uma molécula permitiu, também, a investigação da contribuição EM para as intensificações dos lados anti-Stokes e Stokes. Desta forma, o estudo das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes no nível de detecção de uma única molécula permitiu a estimativa das energias da distribuição de "*hot spots*" iluminados pela radiação laser, o que corresponde a um elemento de grande importância para o efeito SERS.

A contribuição EM nestas flutuações de intensidade foi também investigada através de simulações DDA, as quais permitiram um melhor entendimento dos resultados experimentais obtidos. Por exemplo, mostrou-se a possibilidade de obtenção de altas relações anti-Stokes/Stokes devido a ressonâncias EM de pequena largura, que foram interpretadas como sendo originadas através de interferência entre ressonâncias de plasmon de superfície.

A complexidade do eletrodo ativado quanto ao tipo e número de "*hot spots*" que contribuem para uma dada flutuação de intensidade tornam difícil o estudo do ponto de vista teórico (por exemplo através de simulações Monte Carlo) dos fatores que estão envolvidos nestas flutuações de intensidade em um dado experimento, devido a dificuldade de simular os

"*hot spots*" existentes. Este foi o caso dos sistemas estudados, em que as simulações computacionais foram realizadas para sistemas modelos, que não constituem a realidade de experimentos SERS típicos. Neste caso, experimentos com substratos mais organizados são, sem dúvida, de grande utilidade para tais estudos. Pretende-se, portanto, investigar estas flutuações do ponto de vista experimental para substratos mais organizados, como por exemplo, os nanobastões que podem formar agregados logitudinalmente ("*end-by-end*") e lateralmente ("*side-by-side*") de forma controlada. [107-108] Com sitemas mais organizados como estes pretende-se efetuar as simulações DDA e Monte Carlo para auxiliar as interpretações a cerca das flutuações, de forma semelhante como efetuado nesta tese, porém com a inclusão de outros efeitos, como difusão das nanopartículas coloidais, difusão de moléculas na superfície metálica e efeitos de alterações na orientação de adsorção destas moléculas.

Referências bibliográficas

1. Bohren, C. F.; Huffman, D. R., *Absorption and scattering of light by small particles*. Wiley: 1983.

2. Feynman, R. P.; Leighton, R. B.; Sands, M. L., *The Feynman Lectures on Physics: Quantum mechanics*. Pearson/Addison-Wesley: 1963.

3. Jackson, J. D., *Classical electrodynamics*. Wiley: 1999.

4. Long, D. A., *The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*. Wiley: 2002.

5. Ru, E. C. L.; Etchegoin, P. G., *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy And Related Plasmonic Effects*. Elsevier: Amsterdam, 2008.

6. Aroca, R., *Surface enhanced vibrational spectroscopy*. Wiley: Chichester, 2006.

7. Fleischm.M; Hendra, P. J.; McQuilla.Aj, Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters* **1974,** *26* (2), 163-166.

8. Jeanmaire, D. L.; Vanduyne, R. P., Surface Raman spectroelectrochemisty. 1 Heterocyclic, aromatic and aliphatic-amines adsorbed on anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1977,** *84* (1), 1-20.

9. Albrecht, M. G.; Creighton, J. A., Anomalously intense Raman-spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society* **1977,** *99* (15), 5215-5217.

10. Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; Lu, T. H.; Xu, J., Charge-transfer theory of surface enhanced Raman spectroscopy: Herzberg-Teller contributions. *Journal of Chemical Physics* **1986,** *84* (8), 4174-4180.

11. Corio, P.; Rubim, J. C.; Aroca, R., Contribution of the Herzberg-Teller mechanism to the surface-enhanced Raman scattering of iron phthalocyanine adsorbed on a silver electrode. *Langmuir* **1998,** *14* (15), 4162-4168.

12. Rubim, J. C.; Corio, P.; Ribeiro, M. C. C.; Matz, M., Contribution of Ressonance Raman Scattering to Surface-Enhanced Raman Effect on Electrode Surfaces. A Description Using the Time Dependent Formalism. *Journal of Physical Chemistry* **1995,** *99*, 15765-15774.

13. Ausman, L.; Schatz, G., Dipole Re-Radiation Effects in Surface Enhanced Raman Scattering

The Mie Theory. Hergert, W.; Wriedt, T., Eds. Springer Berlin / Heidelberg: 2012; Vol. 169, pp 135-155.

14. Ausman, L. K.; Schatz, G. C., On the importance of incorporating dipole reradiation in the modeling of surface enhanced Raman scattering from spheres. *Journal of Chemical Physics* **2009,** *131* (8).

15. Mullin, J.; Schatz, G. C., Combined Linear Response Quantum Mechanics and Classical Electrodynamics (QM/ED) Method for the Calculation of Surface-Enhanced Raman Spectra. *Journal of Physical Chemistry A* **2012,** *116* (8), 1931-1938.

16. McMahon, J. M.; Li, S.; Ausman, L. K.; Schatz, G. C., Modeling the Effect of Small Gaps in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C* **2012,** *116* (2), 1627-1637.

17. McMahon, J. M. Topics in Theoretical and Computational Nanoscience: From Controlling Light at the Nanoscale to Calculating Quantum Effects with Classical Electrodynamics. Northwestern University, Evanston, Illinois, 2010.

18. Palik, E. D., *Handbook of Optical Constants of Solids*. Academic Press: 1985.

19. Johnson, P. B.; Christy, R. W., Optical constants of Ag, Au and Cu thin films. *Bulletin of the American Physical Society* **1971,** *16* (7), 785-&.

20. Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C., Basic Electromagnetic Theory of SERS. In *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2010; pp 1-37.

21. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Enviornment. *Journal of Physical Chemistry B* **2003,** *107*, 668-677.

22. Kerker, M.; Wang, D.-S.; Chew, H., Surface enhanced Raman scattering (SERS) by molecules adsorbed at spherical particles: errata. *Applied Optics* **1980,** *19* (24), 4159-4174.

23. Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., Rigorous justification of the E^4 enhancement factor in Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **2006,** *423* (1-3), 63-66.

24. Zhao, J.; Pinchuk, A. O.; McMahon, J. M.; Li, S.; Ausman, L. K.; Atkinson, A. L.; Schatz, G. C., Methods for Describing the Electromagnetic Properties of Silver and Gold Nanoparticles. *Accounts of Chemical Research* **2008,** *41* (12), 1710-1720.

25. Le Ru, E. C.; Grand, J.; Felidj, N.; Aubard, J.; Levi, G.; Hohenau, A.; Krenn, J. R.; Blackie, E.; Etchegoin, P. G., Experimental verification of the SERS electromagnetic model beyond the vertical bar E vertical bar(4) approximation: Polarization effects. *Journal of Physical Chemistry C* **2008,** *112* (22), 8117-8121.

26. Lombardi, J. R.; Birke, R. L., A Unified Approach to Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal Physical Chemistry C* **2008,** *112*, 5605-5617.

27. Lombardi, J. R.; Birke, R. L., A Unified View of Surface-Enhanced Raman Scattering. *Accounts of Chemical Research* **2009,** *42* (6), 734-742.

28. Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G., Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *Journal of Physical Chemistry C* **2007,** *111* (37), 13794-13803.

29. Etchegoin, P. G.; Lacharmoise, P. D.; Le Ru, E. C., Influence of Photostability on Single-Molecule Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors. *Analytical Chemistry* **2009,** *81* (2), 682-688.

30. dos Santos, D. P.; Andrade, G. F. S.; Temperini, M. L. A.; Brolo, A. G., Electrochemical Control of the Time-Dependent Intensity Fluctuations in Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Journal of Physiscal Chemistry C* **2009,** *113* (41), 17737-17744.

31. Andrade, G. F. S.; Micke, G. A.; Tavares, M. F. M.; Temperini, M. L. A., Re-examination of the adsorption and reduction processes of thiosemicarbazide at a silver electrode: SERS, UV–visible and capillary electrophoresis studies. *Journal of Raman Spectroscopy* **2004,** *35* (12), 1034-1041.

32. Etchegoin, P. G.; Meyer, M.; Blackie, E.; Le Ru, E. C., Statistics of single-molecule surface enhanced Raman scattering signals: Fluctuation analysis with multiple analyte techniques. *Analytical Chemistry* **2007,** *79* (21), 8411-8415.

33. Geladi, P., Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **2003,** *58* (5), 767-782.

34. Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1987,** *2* (1-3), 37-52.

35. Sasic, S.; Itoh, T.; Ozaki, Y., Classification of single-molecule surface-enhanced resonance Raman spectra of Rhodamine 6G from isolated Ag colloidal particles by principal component analysis. *Vibrational Spectroscopy* **2006,** *40* (2), 184-191.

36. Team, R. D. C. *R: A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria., 2008.

37. Wang, Z.; Rothberg, L. J., Origins of Blinking in Single-Molecule Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **2005,** *109*, 3387-3391.

38. Itoh, T.; Iga, M.; Tamaru, H.; Yoshida, K.-i.; Biju, V., Quantitative evaluation of blinking in surface enhanced resonance Raman scattering and fluorescence by electromagnetic mechanism. *Journal of Chemical Physics* **2012,** *136*, 0247031-0247037.

39. Kitahama, Y.; Tanaka, Y.; Itoh, T.; Ozaki, Y., Power-law statistics in blinking SERS of thiacyanine adsorbed on a single silver nanoaggregate. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**.

40. Domke, K. F.; Zhang, D.; Pettinger, B., Enhanced Raman spectroscopy: Single molecules or carbon? *Journal of Physical Chemistry C* **2007,** *111* (24), 8611-8616.

41. Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I., Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Physical Review Lettets* **1997,** *78* (9), 1667-1670.

42. Nie, S. M.; Emory, S. R., Probing Single Molecule and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **1997,** *275*, 1102-1106.

43. Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G.; Meyer, M., Enhancement factor distribution around a single surface-enhanced Raman scattering hot spot and its relation to single molecule detection. *Journal of Chemical Physics* **2006,** *125* (20).

44. Hildebrandt, P.; Stockburger, M., *Journal of Physical Chemistry* **1984,** *88* (null), 5935.

45. Bockris, J. O. M.; Khan, S. U. M., *Surface Electrochemistry: a Molecular Level Approach*. Plenum: 1993.

46. Blackie, E.; Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Timmer, M.; Burkett, B.; Northcote, P.; Etchegoin, P. G., Bi-analyte SERS with isotopically edited dyes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008,** *10* (28), 4147-4153.

47. Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C.; Fainstein, A., Bi-analyte single molecule SERS technique with simultaneous spatial resolution. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011,** *13* (10), 4500-4506.

48. Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G., Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study. *Journal of Physical Chemistry C* **2007,** *111* (37), 13794-13803.

49. Dieringer, J. A.; Lettan, R. B.; Scheidt, K. A.; Van Duyne, R. P., A Frequency Domain Existence Proof of Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2007,** *129* (51), 16249-16256.

50. Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C., A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008,** *10* (40), 6079-6089.

51. Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. In *Annual Review of Physical Chemistry, Vol 63*, Johnson, M. A.; Martinez, T. J., Eds. Annual Reviews: Palo Alto, 2012; Vol. 63, pp 65-87.

52. Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G., Proof of Single-Molecule Sensitivity in Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) by Means of a Two-Analyte Technique. *Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110* (4), 1944-1948.

53. Cortes, E.; Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C.; Fainstein, A.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Electrochemical Modulation for Signal Discrimination in Surface Enhanced Raman Scattering (SERS). *Analytical Chemistry* **2010,** *82* (16), 6919-6925.

54. Cortes, E.; Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C.; Fainstein, A.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Monitoring the Electrochemistry of Single Molecules by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2010,** *132* (51), 18034-18037.

55. Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Population Pumping of Excited Vibrational States by Spontaneous Surface-Enhanced Raman Scattering. *Physical Review Lettets* **1996,** *76* (14), 2444-2447.

56. Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., Vibrational pumping and heating under SERS conditions: fact or myth? *Faraday Discussions* **2006,** *132*, 63-75.

57. Widom, B., *Statistical Mechanics: A Concise Introduction for Chemists*. Cambridge University Press: 2002.

58. Haslett, T. L.; Tay, L.; Moskovits, M., Can surface-enhanced Raman scattering serve as a channel for strong optical pumping? *Journal of Chemical Physics* **2000,** *113* (4), 1641-1646.

59. Maher, R. C.; Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C.; Cohen, L. F., A Conclusive Demonstration of Vibrational Pumping under Surface Enhanced Raman Scattering Conditions. *Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110* (24), 11757-11760.

60. Maher, R. C.; Cohen, L. F.; Gallop, J. C.; Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., Temperature-dependent anti-Stokes/Stokes ratios under surface-enhanced Raman scattering conditions. *Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110* (13), 6797-6803.

61. Maher, R. C.; Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C.; Cohen, L. F., A conclusive demonstration of vibrational pumping under Surface Enhanced Raman Scattering conditions. *Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110* (24), 11757-11760.

62. Maher, R. C.; Cohen, L. F.; Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., On the experimental estimation of surface enhanced raman scattering (SERS) cross sections by vibrational pumping. *Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110* (39), 19469-19478.

63. Maher, R. C.; Galloway, C. M.; Le Ru, E. C.; Cohena, L. F.; Etchegoin, P. G., Vibrational pumping in surface enhanced Raman scattering (SERS). *Chemical Society Reviews* **2008,** *37* (5), 965-979.

64. Brolo, A. G.; Sanderson, A. C.; Smith, A. P., Ratio of the surface-enhanced anti-Stokes scattering to the surface-enhanced Stokes-Raman scattering for molecules adsorbed on a silver electrode. *Physical Review B* **2004,** *69* (4), 045424-1 - 045424-9.

65. Lee, P. C.; Meisel, D., Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry* **1982,** *17* (3391-3395).

66. Liang, E. J.; Ye, X. L.; Kiefer, W., Interaction of halide and halate ions with colloidal silver and their influence on surface-enhanced Raman scattering of pyridine with near-infrared excitation. *Vibrational Spectroscopy* **1997,** *15* (1), 69-78.

67. Park, S. S.; Kim, K.; Kim, M. S., Adsorption of halides on specific reaction sites on the silver sol surface as investigated by Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **1994,** *230* (1–2), 171-176.

68. Pettinger, B.; Philpott, M. R.; Gordon, J. G., Surface-enhanced Raman spectroscopy of metal-halide vibrations on silver and copper electrodes. *The Journal of Physical Chemistry* **1981,** *85* (19), 2746-2751.

69. Galloway, C. M.; Ru, E. C. L.; Etchegoin, P. G., An Iterative Algorithm for Background Removal in Spectroscopy by Wavelet Transforms. *Applied Spectroscopy* **2009,** *63* (12), 1370-1376.

70. Mahajan, S.; Cole, R. M.; Speed, J. D.; Pelfrey, S. H.; Russell, A. E.; Bartlett, P. N.; Barnett, S. M.; Baumberg, J. J., Understanding the Surface-Enhanced Raman Spectroscopy "Background"†. *Journal of Physical Chemistry C* **2009,** *114* (16), 7242-7250.

71. Wu, D.-Y.; Li, J.-F.; Ren, B.; Tian, Z.-Q., Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy of nanostructures. *Chemical Society Review.* **2008,** *37* (5), 1025-1041.

72. Corio, P.; Temperini, M. L. A.; Santos, P. S.; Rubim, J. C., Contribution of the charge transfer mechanism to the surface-enhanced Raman scattering of the binuclear ion complex Fe-2((Bpe)(CN))(10) (6-) adsorbed on a silver electrode in different solvents. *Langmuir* **1999,** *15* (7), 2500-2507.

73. Titus, E. J.; Weber, M. L.; Stranahan, S. M.; Willets, K. A., Super-Resolution SERS Imaging beyond the Single-Molecule Limit: An Isotope-Edited Approach. *Nano Letters* **2012,** *12* (10), 5103-5110.

74. Cañamares, M. V.; Chenal, C.; Birke, R. L.; Lombardi, J. R., DFT, SERS, and Single-Molecule SERS of Crystal Violet. *The Journal of Physical Chemistry C* **2008,** *112* (51), 20295-20300.

75. Liang, E. J.; Ye, X. L.; Kiefer, W., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Crystal Violet in the Presence of Halide and Halate Ions with Near-Infrared Wavelength Excitation. *The Journal of Physical Chemistry A* **1997,** *101* (40), 7330-7335.

76. Watanabe, T.; Pettinger, B., Surface-enhanced Raman scattering from crystal violet adsorbed on a silver electrode. *Chemical Physics Letters* **1982,** *89* (6), 501-507.

77. Jiang, J. D.; Burstein, E.; Kobayashi, H., Resonant Raman Scattering by Crystal-Violet Molecules Adsorbed on a Smooth Gold Surface: Evidence for a Charge-Transfer Excitation. *Physical Review Lettets* **1986,** *57* (14), 1793-1796.

78. Angeloni, L.; Smulevich, G.; Marzocchi, M. P., Resonance raman spectra of conjugated chromophores. evidence for electronic and vibrational couplings in crystal violet. *Journal of Molecular Structure* **1980,** *61* (0), 331-336.

79. Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G., Proof of single-mokeule sensitivity in surface enhanced Raman scattering (SERS) by means of a two-analyte technique. *Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110* (4), 1944-1948.

80. Blackie, E.; Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Timmer, M.; Burkett, B.; Northcote, P.; Etchegoin, P. G., Bi-analyte SERS with isotopically edited dyes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008,** *10* (28), 4147-4153.

81. Galloway, C. M.; Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., An Iterative Algorithm for Background Removal in Spectroscopy by Wavelet Transforms. *Applied Spectroscopy* **2009,** *63* (12), 1370-1376.

82. Moore, A. A.; Jacobson, M. L.; Belabas, N.; Rowlen, K. L.; Jonas, D. M., 2D Correlation Analysis of the Continuum in Single Molecule Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2005,** *127* (20), 7292-7293.

83. Itoh, T.; Kikkawa, Y.; Biju, V.; Ishikawa, M.; Ikehata, A.; Ozaki, Y., Variations in Steady-State and Time-Resolved Background Luminescence from Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering-Active Single Ag Nanoaggregates. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110* (43), 21536-21544.

84. Itoh, T.; Kikkawa, Y.; Yoshida, K.; Hashimoto, K.; Biju, V.; Ishikawa, M.; Ozaki, Y., Correlated measurements of plasmon resonance Rayleigh scattering and surface-enhanced resonance Raman scattering using a dark-field microspectroscopic system. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2006,** *183* (3), 322-328.

85. Itoh, T.; Yoshikawa, H.; Yoshida, K.-i.; Biju, V.; Ishikawa, M., Spectral variations in background light emission of surface-enhanced resonance hyper Raman scattering coupled

with plasma resonance of individual silver nanoaggregates. *The Journal of Chemical Physics* **2010,** *133* (12), 124704-8.

86. Hale, G. M.; Querry, M. R., Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-μm Wavelength Region. *Applied Optics* **1973,** *12* (3), 555-563.

87. Yong, S. J.; Arkady, M. S.; Chang Sub, K., Classical analogy of Fano resonances. *Physica Scripta* **2006,** *74* (2), 259.

88. Schomacker, K. T.; Bangcharoenpaurpong, O.; Champion, P. M., INVESTIGATIONS OF THE STOKES AND ANTI-STOKES RESONANCE RAMAN-SCATTERING OF CYTOCHROME-C. *Journal of Chemical Physics* **1984,** *80* (10), 4701-4717.

89. Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Blackie, E.; Etchegoin, P. G., Advanced aspects of electromagnetic SERS enhancement factors at a hot spot. *Journal of Raman Spectroscopy* **2008,** *39* (9), 1127-1134.

90. Kahnert, F. M., Numerical methods in electromagnetic scattering theory. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer 79–80* (0), 775-824.

91. Yurkin, M. A.; Hoekstra, A. G., The discrete dipole approximation: An overview and recent developments. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* **2007,** *106* (1-3), 558-589.

92. Draine, B. T.; Flatau, P. J., Discrete-dipole appoximation for scattering calculations. *J. Opt. Soc. Am. A* **1994,** *11* (4), 1491.

93. Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C.; Meyer, M., An analytic model for the optical properties of gold (vol 125, pg 164705, 2006). *Journal of Chemical Physics* **2007,** *127* (18).

94. Draine, B. T.; Flatau, P. J., Discrete-dipole approximation for scattering calculations. *J. Opt. Soc. Am. A* **1994,** *11* (4), 1491-1499.

95. Litz, J. P.; Camden, J. P.; Masiello, D., Spatial, Spectral, and Coherence Mapping of Single-Molecule SERS Active Hot Spots via the Discrete-Dipole Approximation. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2011,** *2*, 1695-1700.

96. Yang, W. H.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P., Discrete dipole approximation for calculating extinction and Raman intensities for small particles with arbitrary shapes. *Journal of Chemical Physics* **1995,** *103* (3), 869-875.

97. Draine, B. T.; Flatau, P. J. *User Guide to the Discrete Dipole Appoximation Code DDSCAT 7.1*, 2010.

98. Sleijpen, G. G.; Vorst, H., Maintaining convergence properties of BiCGstab methods in finite precision arithmetic. *Numerical Algorithms* **1995,** *10* (2), 203-223.

99. dos Santos, D. P.; Temperini, M. L. A.; Brolo, A. G., Mapping the Energy Distribution of SERRS Hot Spots from Anti-Stokes to Stokes Intensity Ratios. *Journal of the American Chemical Society* **2012,** *134* (32), 13492-13500.

100. Frens, G., Controled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions. *Nature-Physical Science* **1973,** *241* (105), 20-22.

101. Hao, E.; Schatz, G. C., Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *Journal of Chemical Physics* **2004,** *120* (1), 357-366.

102. Hartland, G. V., Optical Studies of Dynamics in Noble Metal Nanostructures. *Chemical Reviews* **2011,** *111* (6), 3858-3887.

103. Blaber, M. G.; Henry, A.-I.; Bingham, J. M.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P., LSPR Imaging of Silver Triangular Nanoprisms: Correlating Scattering with Structure Using Electrodynamics for Plasmon Lifetime Analysis. *Journal of Physical Chemistry C* **2012,** *116* (1), 393-403.

104. Zou, S. L.; Schatz, G. C., Narrow plasmonic/photonic extinction and scattering line shapes for one and two dimensional silver nanoparticle arrays. *Journal of Chemical Physics* **2004,** *121* (24), 12606-12612.

105. Zou, S. L.; Janel, N.; Schatz, G. C., Silver nanoparticle array structures that produce remarkably narrow plasmon lineshapes. *Journal of Chemical Physics* **2004,** *120* (23), 10871-10875.

106. Zhao, L. L.; Kelly, K. L.; Schatz, G. C., The extinction spectra of silver nanoparticle arrays: Influence of array structure on plasmon resonance wavelength and width. *Journal of Physical Chemistry B* **2003,** *107* (30), 7343-7350.

107. Lee, A.; Ahmed, A.; dos Santos, D. P.; Coombs, N.; Park, J. I.; Gordon, R.; Brolo, A. G.; Kumacheva, E., Side-by-Side Assembly of Gold Nanorods Reduces Ensemble-Averaged SERS Intensity. *Journal of Physical Chemistry C* **2012,** *116* (9), 5538-5545.

108. Lee, A.; Andrade, G. F. S.; Ahmed, A.; Souza, M. L.; Coombs, N.; Tumarkin, E.; Liu, K.; Gordon, R.; Brolo, A. G.; Kumacheva, E., Probing Dynamic Generation of Hot-Spots in Self-Assembled Chains of Gold Nanorods by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Journal of the American Chemical Society* **2011,** *133* (19), 7563-7570.

109. Blaber, M. G.; Schatz, G. C., Extending SERS into the infrared with dimers of gold nanospheres and nanorods. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2011,** *242*.

110. McMahon, J. M.; Li, S. Z.; Ausman, L. K.; Schatz, G. C., Modeling the Effect of Small Gaps in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C* **2012,** *116* (2), 1627-1637.

111. Jain, P. K.; El-Sayed, M. A., Plasmonic coupling in noble metal nanostructures. *Chemical Physics Letters* **2010,** *487* (4–6), 153-164.

112. Jain, P. K.; Huang, W.; El-Sayed, M. A., On the Universal Scaling Behavior of the Distance Decay of Plasmon Coupling in Metal Nanoparticle Pairs: A Plasmon Ruler Equation. *Nano Letters* **2007,** *7* (7), 2080-2088.

113. Jain, P. K.; Eustis, S.; El-Sayed, M. A., Plasmon Coupling in Nanorod Assemblies: Optical Absorption, Discrete Dipole Approximation Simulation, and Exciton-Coupling Model. *Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110* (37), 18243-18253.

114. Ye, X.; Jin, L.; Caglayan, H.; Chen, J.; Xing, G.; Zheng, C.; Doan-Nguyen, V.; Kang, Y.; Engheta, N.; Kagan, C. R.; Murray, C. B., Improved Size-Tunable Synthesis of Monodisperse Gold Nanorods through the Use of Aromatic Additives. *ACS Nano* **2012,** *6* (3), 2804-2817.

115. Satpathy, S.; Roy, A.; Mohapatra, A., Fano interference in classical oscillators. *European Journal of Physics* **2012,** *33* (4), 863.

116. Miroshnichenko, A. E.; Flach, S.; Kivshar, Y. S., Fano resonances in nanoscale structures. *Reviews of Modern Physics* **2010,** *82* (3), 2257-2298.

117. Luk'yanchuk, B.; Zheludev, N. I.; Maier, S. A.; Halas, N. J.; Nordlander, P.; Giessen, H.; Chong, C. T., The Fano resonance in plasmonic nanostructures and metamaterials. *Nat Mater* **2010,** *9* (9), 707-715.

118. López-Tejeira, F.; Paniagua-Domínguez, R.; Rodríguez-Oliveros, R.; Sánchez-Gil, J. A., Fano-like interference of plasmon resonances at a single rod-shaped nanoantenna. *New Journal of Physics* **2012,** *14* (2), 023035.

119. Mirin, N. A.; Bao, K.; Nordlander, P., Fano Resonances in Plasmonic Nanoparticle Aggregates†. *Journal of Physical Chemistry A* **2009,** *113* (16), 4028-4034.

120. Reed, J. M.; Wang, H.; Hu, W.; Zou, S., Shape of Fano resonance line spectra calculated for silver nanorods. *Optics Letters* **2011,** *36* (22), 4386-4388.

121. Riffe, D. M., Classical Fano oscillator. *Physical Review B* **2011,** *84* (6), 064308.

122. Weiss, A.; Haran, G., Time-Dependent Single-Molecule Raman Scattering as a Prove of Surface Dynamics. *Journal of Physical Chemistry B* **2001,** *105*, 12348-12354.

123. Bosnik, K. A.; Jiang, J.; Brus, L. E., *Journal of Physical Chemistry B* **2002,** *106*, 8096.

124. Mokovits, M.; Tay, L. L.; Yang, J.; Haslett, T., *Topics in Applied Physics* **2002,** *82*, 215.

125. Bizzarri, A. R.; Salvatore, C., Lévy Statististics of Vibrational Mode Fluctuations of Single Molecules from Surface-Enhanced Raman Scattering. *Physical Review Lettets* **2005,** *94*, 0683031-0683034.

126. Fichthorn, K. A.; Weinberg, W. H., Theoretical foundations of dynamical Monte Carlo simulations. *The Journal of Chemical Physics* **1991,** *95* (2), 1090-1096.

127. Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G.; Meyer, M., Enhancement factor distribution around a single surface-enhanced Raman scattering hot spot and its relation to single molecule detection. *Journal of Chemical Physics* **2006,** *125* (20), 204701-1 - 204701-13.

128. Lorenzo, E.; Sanchez, L.; Pariente, F.; Tirado, J.; Abruna, H. D., Thermodynamics and kinetics of adsorption and electrocatalysis of NADH oxidation with a self assembling quinone derivative *Analytica Chimica Acta* **1995,** *309* (1-3), 79-88.

129. Tsourkas, P. K.; Baumgarth, N.; Simon, S. I.; Raychaudhuri, S., Mechanisms of B-Cell Synapse Formation Predicted by Monte Carlo Simulation. *Biophys. J.* **2007,** *92* (12), 4196-4208.

130. Tsourkas, P. K.; Longo, M. L.; Raychaudhuri, S., Monte Carlo Study of Single Molecule Diffusion Can Elucidate the Mechanism of B Cell Synapse Formation. *Biophysics Journal* **2008,** *95* (3), 1118-1125.

131. Gendron, P. O.; Avaltroni, F.; Wilkinson, K., Diffusion Coefficients of Several Rhodamine Derivatives as Determined by Pulsed Field Gradient–Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Journal of Fluorescence* **2008,** *18* (6), 1093-1101.

132. Watanabe, H.; Hayazawa, N.; Inouye, Y.; Kawata, S., DFT Vibrational Calculations of Rhodamine 6G Adsorbed on Silver: Analysis of Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **2005,** *109* (11), 5012-5020.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Diego Pereira dos Santos

Local e data de nascimento: São Paulo, 12 de julho de 1986.

2. EDUCAÇÃO

- Ensino fundamental e médio

Escola Estadual João Baptista de Oliveira

Escola Estadual Jardim Paraíso

- Ensino superior

Bacharelado em Química. Instituto de Química de Universidade de São Paulo (IQUSP), São Paulo, 2008.

- Bolsas

- Iniciação científica, CNPq, no Laboratório de Espectroscopia Molecular sob orientação da profa. Dra. Marcia Laudelina Arruda Temperini. 01/07/2005 a 01/12/2008.

- Bolsista de Doutorado, CNPq, no Laboratório de Espectroscopia Molecular sob orientação da profa. Dra. Marcia Laudelina Arruda Temperini 01/02/2009 a 01/02/2013.

4. PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

- Artigos:

1 - **dos Santos, D. P.**; Temperini, M. L. A.; Brolo, A. G., ***Journal of the American Chemical Society*** 134, 13492-13500 (2012).

2 - Lee, A.; Ahmed, A.; **dos Santos, D. P.;** Coombs, N.; Park, J. I.; Gordon, R.; Brolo, A. G.; Kumacheva, E., ***Journal of Phyiscal Chemistry C*** 116, 5538-5545 (2012).

3 - **dos Santos, D. P.**; Andrade, G. F. S.; Brolo, A. G.; Temperini, M. L. A., ***Chem. Comm.*** 47, 7158-7160 (2011).

Prêmio Qualidade em Publicação CAPES, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2012.

4 - **dos Santos, D. P.**; Andrade, G. F. S.; Sant'Ana, A. C.; Temperini, M. L. A., ***Química Nova*** 33, 2093-2097 (2010).

5 - **dos Santos, D. P.**; Andrade, G. F. S.; Temperini, M. L. A.; Brolo, A. G., ***Journal of Phyiscal Chemistry C*** 113, 17737-17744 (2009).

6 - Batista, E. A.; **dos Santos, D. P.**; Andrade, G. F. S.; Sant'Ana, A. C.; Brolo, A. G.; Temperini, M. L. A., ***Journal of Nanoscience and Nanotechnology*** 9, 3233-3238 (2009).

Resumos em congressos:

1 - **dos Santos D. P.**, Brolo, A. G., Temperini, M. L. A. **II Congresso Institucional do IQUSP**. "SERRS no regime de uma molécula: sondando contribuições ressonantes através das relações de intensidade anti-Stokes/Stokes". 2012. (Painel)

2 - **dos Santos D. P.**, Temperini, M. L. A., Brolo, A. G. **II Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman (Enbraer)**. "Sondando a distribuição de energias nos SERS hot spots pela relação de intensidades anti-Stokes e Stokes". 2011. (Apresentação oral)

3 - **dos Santos D. P.**, Andrade, G. F. S, Brolo, A. G. , Temperini, M. L. A. **I Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman (Enbraer)**. "Espectroscopia Raman Intensificada pela Superfície (SERS) no regime de uma única molécula". 2009. (Apresentação oral)

4 - **dos Santos, D. P.**, Andrade, G. F. S., Brolo, A. G., Temperini, M. L. A. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. "Espectroscopia Raman Intensificada pela

Superfície (SERS) no regime de uma única molécula". 2009. (Apresentação oral e Painel).

5 - **dos Santos, D. P.**, Andrade, G. F. S., Temperini, M. L. A. **24ª Semana da Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo**. "Substratos de Au nanoestruturados para espectroscopia Raman". 2007. (Painel).

6 - **dos Santos, D. P.**, Andrade, G. F. S., Temperini, M. L. A. **15º Simpósio Internacional de Iniciação científica da Universidade de São Paulo - SIICUSP**. "Substratos nanoestruturados de Au para SERS". 2007. (Painel).

7 - **dos Santos, D. P.**, Andrade, G. F. S., Temperini, M. L. A. **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. "Nanoestruturas de Au sobre FTO obtidas por mascaramento como substratos para o efeito SERS". 2007. (Painel).

8 - **dos Santos, D. P.**, Andrade, G. F. S., Temperini, M. L. A. **23ª Semana da Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo**. "Desenvolvimento de substratos SERS-ativos". 2006. (Painel).

9 - **dos Santos, D. P.**, Andrade, G. F. S., Temperini, M. L. A. **14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo - SIICUSP**. "Desenvolvimento de substratos SERS-ativos". 2006. (Painel).