Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Daniel Grasseschi

**Uma Abordagem Fundamental sobre
Nanopartículas de Ouro**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG

04/02/2015

Daniel Grasseschi

**Uma Abordagem Fundamental sobre
Nanopartículas de Ouro**

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

Orientador (a): Prof. Dr. Henrique Eisi Toma

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Grasseschi, Daniel
G768a Uma abordagem fundamental sobre nanopartículas de ouro /
Daniel Grasseschi. -- São Paulo, 2015.
338p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Toma, Henrique Eisi

1. Química inorgânica 2. Nanotecnologia I. T. II. Toma,
Henrique Eisi, orientador.

Eu dedico está tese à minha família, ao Vitor e à Luiza.

Agradecimentos

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais, por todo apoio emocional e financeiro. Por nunca medirem esforços para me dar condições de estudar e fazer o que gosto. Se hoje cheguei onde estou e conquistei meu espaço foi tudo graças a eles.

Agradeço ao Professor Henrique Toma pela paciência, pelas discussões, pela orientação e principalmente pela liberdade de realizar minha pesquisa e meus trabalhos, mesmo quando nossas ideias divergiam.

Agradeço ao Professor Koiti Araki, por sempre estar aberto para discutir ciência em alto nível.

Agradeço ao Professor Vitor Zamarion por toda orientação desde minha iniciação científica; Por mostrar uma visão única sobre a ciência, por me incentivar sempre a ir o mais fundo possível nos trabalhos e não fazer simplesmente para ter mais um trabalho. Agradeço por todas discussões filosóficas, sempre incentivando a propagar o certo e o bem, acima de tudo. Agradeço de coração a todos esses anos de amizade.

Agradeço ao Professor Rômulo Augusto Ando por toda ajuda na realização dos cálculos teóricos, que foram imprescindíveis para o fechamento dessa tese.

Agradeço ao Professor Hernan Chaimovich e a Professora Iolanda M. Cuccovia por gentilmente cederem o laboratório e o equipamento para realização de medidas de espalhamento de luz.

Agradeço ao amigo Filipe Lima por todos trabalhos realizados juntos, que apesar de não estarem na tese, me ajudaram a ter um entendimento mais profundo sobre química de colóides. Agradeço também pelas besteiras que falávamos e pelas cervejas.

Agradeço à Professora Marcia Temperini, ao Professor Mauro Carlos Ribeiro e ao Professor Paulo Sergio Santos por todas aulas de espectroscopia que me deram a base para realização dos experimentos apresentados nessa tese.

Agradeço de coração a Maria Luiza Pereira pela amizade, por estar comigo em um período difícil da minha vida, por me ajudar a levantar depois de alguns tropeços, pelas conversas intermináveis, pelas brincadeiras, corridas na raia, pelos dias no CEPE, por toda parceria e pela disposição de ler e corrigir a tese.

Agradeço ao André Luís Parussulo e ao Tiago Araújo Matias por todos os anos de amizade e parceria, por todas discussões e conversas, pelas idas no “Frangão”, cervejas, viagens e por deixarem o ambiente do laboratório sempre descontraído.

Agradeço ao José Miranda quetenho como um irmão. Ao Gabriel Negrão por toda amizade e ajuda desde a graduação. Agradeço a todos a todos os “07”, Robson, Leonardo, Alfredo, Mikhael, Lucas, João, João Messias, Márcio, Danilo, Eli, Leandro, Guilherme, Janaina, Tessa e Tatiana por tudo que passamos desde o ano de 2007 e por tudo que vamos passar.

Agradeço a todos bons amigos que fiz durante esses anos, Henrique Franciscato, Andre Oliveira, Maiara Oliveira, Rafael Maximinio, Daniel Fonseca, Nelson Martin, Henrique Rocha, Gerson Hideo, Ana Tomioshi e Carla Santana. E espero levar todos para o resto da minha vida.

Agradeço aos alunos de iniciação científica Wilson Akira e Jorge Shinohara, por me ensinarem a começar a lidar com alunos e mostrarem como melhorar sempre. Obrigado por todos os trabalhos realizados juntos, espero que ainda venham muitos mais.

Agradeço a todos colegas e amigos do LQSN: Rosana, Juan, Sabrina, Caterina, Manuel, Bernardo, Paulo, Júlio, Marcelo, Fernando e Ana. Agradeço em especial ao Alceu por organizar e levar todo o laboratório nas costas.

Agradeço ao Carlos Eduardo e ao Fábio Basílio pela amizade incondicional desde nossa infância.

Agradeço a todos que estão e passaram pela minha vida, pois de alguma forma todas experiências contribuíram para meu crescimento e trouxeram algo novo para aprender.

Agradeço à FAPESP pela bolsa concedida.

“Não é porque todos fazem errado, que o errado se torna certo. E não é porque poucos fazem o certo que o certo é impossível!”

“Seja a mudança que você quer observar no Mundo.” Mahatma Gandhi

Resumo

Grasseschi, D. “Uma Abordagem Fundamental sobre Nanopartículas de Ouro” 2015. 280p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O estudo sistemático de nanopartículas de ouro utilizando conceitos fundamentais de química de coordenação e físico-química é o foco principal desta tese, que trata principalmente da natureza das interações moleculares na superfície de nanopartículas. Para tal finalidade, estudou-se como as variações dos parâmetros experimentais influenciam no mecanismo de formação das partículas pelo “método de Turkevich”. Observou-se que, não somente, a morfologia e as propriedades ópticas estão atreladas aos processos de nucleação e crescimento, mas também a composição e as propriedades químicas da camada molecular ao redor das partículas. Dessa forma, foi possível comprovar, teórica e experimentalmente, que um intermediário instável da reação de oxidação do citrato de sódio, a acetonadicarboxilato, se torna estável devido a coordenação aos átomos superficiais de ouro. Isto leva a propriedades químicas e espectroscópicas distintas, principalmente, frente a reações de troca de ligantes na superfície das partículas. Foi feito um estudo, teórico e experimental, sistemático das propriedades das moléculas de etanobis(tioamida) na superfície de diferentes nanopartículas de ouro, comprovando que a presença de acetonadicarboxilato, ao final da síntese das partículas, influencia drasticamente nas propriedades do sistema.

Palavras chave: interfaces, superfícies, nanopartículas, SERS, química de coordenação

Abstract

Grasseschi, D. "A Fundamental Approach about Gold Nanoparticles" 2015. 280p. Ph.D Thesis – Graduate Program in Chemistry. Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo.

The systematic study of gold nanoparticles using fundamental concepts of coordination and physical chemistry is the focus of this thesis, devoting an especial attention for molecular interactions nature at the particles surface. For this goal, the effects of many experimental parameters on the gold nanoparticles formation by the Turkevich method have been studied. It has been shown that not only the morphology and optical properties are controlled by the nucleation and growth processes, but also the chemical properties of the molecular layer at the particles surface. In this way, it has been proved, theoretical and experimentally, that an instable oxidation product of the sodium citrate reaction with the gold salt, a ketonedicarboxylate species, is stabilized by coordination with the superficial gold atoms. This fact leads to distinct chemistry and spectroscopic properties, mainly, related to the reactions at the gold surface. IN addition, a carefully theoretical and experimentally study has been carried out exploring the characteristics of the ethanebis(thioamide) molecules on the surface of different particles. It has been demonstrated that the ketonedicarboxylate presence, from the synthesis process, drastic influences the system properties.

Key Words: interfaces, surfaces, nanoparticles, SERS, coordination chemistry

Lista de Figuras

<i>Figura 1: Espectro Eletromagnético, com destaque para a região do visível.</i>	28
<i>Figura 2: Processo de formação das cores através da mistura aditiva (acima) e subtrativa (abaixo).</i>	29
<i>Figura 3: Cubo de cores para o espaço RGB.</i>	30
<i>Figura 4: Cálice de Licurgo</i>	31
<i>Figura 5: Funcionalização de AuNP com complexos de ferro(II) e derivados de terpiridina. Adaptado da referência ⁵³</i>	38
<i>Figura 6: Funcionalização de AUNP com ligante TPASH e complexos de ferro.</i>	39
<i>Figura 7: Esquema do microscópio hiperespectral de campo escuro.</i>	46
<i>Figura 8: Faixa de composição de comprimentos de onda par cada canal de cor do espectro RGB.</i>	47
<i>Figura 9: Interface gráfica do MasterView</i>	48
<i>Figura 10: Configuração da webcam</i>	49
<i>Figura 11: Esquema da variação de energia livre de Gibbs durante as etapas de formação de nanocristais</i>	54
<i>Figura 12: Representação da separação entre as etapas de nucleação e crescimento</i>	55
<i>Figura 13: Gráfico de LaMer: variação da condição de supersaturação em função do tempo, onde S é a supersaturação e S_c a supersaturação crítica.⁷⁰</i>	56
<i>Figura 14: Variação de energia livre em função do raio do núcleo.⁶⁹</i>	58
<i>Figura 15: Variação do número de partículas em função do tempo para diferentes valores de (a) supersaturação, (b) temperatura e (c) energia livre superficial. Adaptado da referência ⁷⁰</i>	59
<i>Figura 16: Gradiente de concentração de monômeros na periferia dos cristais.⁶⁹</i>	60
<i>Figura 17: Mecanismo proposto por Li et al. para formação das AuNPs pelo método de Turkevich. Retirado da referência ⁹³</i>	65
<i>Figura 18: Esquema de reações envolvidas no processo de formação de AuNP pelo método de Turkevich.</i>	66

<i>Figura 19: Cinética dos processos envolvidos na formação de AuNP pelo método de Turkevich acompanhados por SAXS e XANES.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 20: Sistema de reação utilizado para síntese de AuNP e análise em tempo real da cinética de formação</i>	<i>72</i>
<i>Figura 21: Distribuição de tamanhos para os ensaios 1 a 8, calculada a partir da contagem de 1000 partículas nas imagens de MEV.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 22: Distribuição de tamanhos para os ensaios 13 a 16, calculada a partir da contagem de 1000 partículas nas imagens de MEV.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 23: Microscopias Eletrônica de Varredura dos ensaios 1 a 8</i>	<i>82</i>
<i>Figura 24: Microscopia Eletrônica de Varredura dos ensaios 9 a 16.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 25: Variação de absorbância em 535, 540 e 785 nm (topo) e variação do espectro RGB (em baixo) em função do tempo. A região I representa a etapa de redução do sal de ouro dando início a etapa de nucleação. A região II representa a aglomeração dos núcleos formando fios. A região III indica o crescimento, em diâmetro dos fios. A região IV é marcada pelo processo de desagregação gerando partículas esféricas. Na região V a estabilização dos componentes do espectro RGB indica o término do crescimento.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 26: Variação do espectro de extinção ao decorrer da formação das AuNPs. As setas pretas indicam as mudanças iniciais, e as setas vermelhas indicam as mudanças em tempos mais longos.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 27: Curvas de variação do espectro RGB em função do tempo para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D).</i>	<i>91</i>
<i>Figura 28: Curvas de variação do espectro RGB em função do tempo para os ensaios 5 (A), 6 (B), 7 (C) e 8 (D).</i>	<i>94</i>
<i>Figura 29: (A) Distribuição de tamanhos e (B) variação do espectro RGB para síntese utilizando proporção de citrato: Au de 7:1. (C) Distribuição de tamanhos e (D) variação do espectro RGB para síntese utilizando proporção de citrato: Au de 14:1.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 30: Distribuição de tamanho para as partículas ceto-AuNP (A) e cit-AuNP (B).</i>	<i>101</i>
<i>Figura 31: Imagens de MEV das partículas ceto-AuNP (A) e cit-AuNP (B).</i>	<i>101</i>
<i>Figura 32 Curva de variação do espectro RGB para as sínteses cit-AuNP (A) e ceto-AuNP (B).</i>	<i>102</i>
<i>Figura 33: Dipolo oscilante induzido por radiação eletromagnética em nanopartículas metálicas.</i>	<i>106</i>

<i>Figura 34: Espectro de extinção de nanopartículas esféricas e sua dependência com o tamanho da partícula, obtidos através da teoria de Mie.</i>	<i>109</i>
<i>Figura 35: Orbitais moleculares (A) e espectro eletrônico (B) calculados para um cluster de Au₂₀. Adaptado da referência ⁴¹.</i>	<i>112</i>
<i>Figura 36: Acoplamento entre os dipolos de nanopartículas. Adaptado da referência ¹³.</i>	<i>116</i>
<i>Figura 37: Acoplamento plasmônico descrito pela teoria de hibridização de plasmons. Adaptado da referência ¹³¹.</i>	<i>118</i>
<i>Figura 38: Comparação entre o tratamento por hibridização de plasmons (curva vermelha) e o modelo quântico (curva azul) para o acoplamento plasmônico. Retirado da referência ¹³⁷.</i>	<i>119</i>
<i>Figura 39: Foto das nanopartículas de ouro sintetizadas utilizando o planejamento fatorial. A numeração indicada está de acordo com os ensaios detalhados na Tabela 1. Em A, a iluminação é feita por trás, portanto observa-se a radiação transmitida através da dispersão de AuNP. Em B, a iluminação é feita pela frente, e observa-se a radiação espalhada pelas partículas.</i>	<i>121</i>
<i>Figura 40: Espectros de Extinção das AuNP. (A) Ensaios 1 a 4, (B) ensaios 5 a 8, (C) ensaios 9 a 12, (D) ensaios 13 a 16.</i>	<i>123</i>
<i>Figura 41: Espectro de extinção das sínteses realizadas fora do planejamento fatorial. (A) cit-AuNP e cetoAuNP. (B) Sínteses com excesso de citrato.</i>	<i>124</i>
<i>Figura 42: Seções de Choque calculadas para diferentes tamanhos de AuNP utilizando a teoria Mie. (A) Seção de choque da absorção. (B) Seção de choque de espalhamento. (C) Seção de choque de extinção.</i>	<i>125</i>
<i>Figura 43: Deconvolução dos espectros de extinção das AuNP em funções gaussianas. (A) ensaio 16, (B) 7 x Cit. (C) ensaio 2. (D) ceto-AuNP. (E) cit-AuNP.</i>	<i>127</i>
<i>Figura 44: Imagens ópticas de microscopia de campo escuro das amostras com 7 vezes de excesso de citrato (A), amostra 16 (B), ceto-AuNP (C), cit-AuNP (D) e amostra 2 (E). Seção de choque de espalhamento para partículas esféricas calculas pela teoria de Mie (F).</i>	<i>129</i>
<i>Figura 45: (A) Imagem óptica de campo escuro, (B) Imagem hiperespectral e (C) espectros de espalhamento de AuNP de 10 nm</i>	<i>130</i>
<i>Figura 46: (A) Imagem óptica de campo escuro, (B) Imagem hiperespectral e (C) espectros de espalhamento de AuNP do ensaio 16</i>	<i>130</i>

<i>Figura 47: (A) Imagem óptica de campo escuro, (B) Imagem hiperespectral e espectros de espalhamento das partículas verdes (C) e vermelhas (D) da ceto-AuNP.....</i>	<i>130</i>
<i>Figura 48: (A) Imagem óptica de campo escuro, (B) Imagem hiperespectral e e espectros de espalhamento das partículas verdes (C) e vermelhas (D) da cit-AuNP.....</i>	<i>131</i>
<i>Figura 49: Seções de choque de extinção, absorção e espalhamentos, calculadas pela teoria de Mie para nanopartículas de ouro de 45 nm, em água, com índice de refração de 1.33 (a) e sílica com índice de refração de 1.52 (b).</i>	<i>132</i>
<i>Figura 50: Imagens hiperespectrais de campo escuro e seus respectivos espectros de espalhamentos pra o ensaio 2. Juntamente são apresentadas algumas imagens de MEV de possíveis partículas responsáveis pelos espectros de espalhamento apresentados.....</i>	<i>135</i>
<i>Figura 51: Decomposição dos canais RGB das imagens ópticas e hiperespectral de campo escuro. Exemplo dos comprimentos de onda utilizados na composição da imagem hiperespectral em relação aos espectros de espalhamento. Comparação das análises com as cit-AuNPs.....</i>	<i>137</i>
<i>Figura 52: Ajuste de curvas Lorentziana aos espectros de espalhamento das partículas (A) 7 x Cit, (B) ensaio 16, (C) cit-AuNP e (D) ceto-AuNP.</i>	<i>140</i>
<i>Figura 53: Espectros de extinção de soluções contendo cit-AuNP e NaF em diferentes concentrações. Os espectros foram adquiridos em um tempo total de 30 minutos com um intervalo de 30 segundos entre cada aquisição e são mostrados os espectros a cada dois minutos para facilitar a visualização.</i>	<i>144</i>
<i>Figura 54: Espectros de extinção de soluções contendo cit-AuNP e NaCl em diferentes concentrações. Os espectros foram adquiridos em um tempo total de 30 minutos com um intervalo de 30 segundos entre cada aquisição e são mostrados os espectros a cada dois minutos para facilitar a visualização.</i>	<i>145</i>
<i>Figura 55: Espectros de extinção de soluções contendo cit-AuNP e NaBr em diferentes concentrações. Os espectros foram adquiridos em um tempo total de 30 minutos com um intervalo de 30 segundos entre cada aquisição e são mostrados os espectros a cada dois minutos para facilitar a visualização.</i>	<i>145</i>
<i>Figura 56: Espectros de extinção de soluções contendo cit-AuNP e NaI em diferentes concentrações. Os espectros foram adquiridos em um tempo total de 30 minutos com um intervalo de 30 segundos entre cada aquisição e são mostrados os espectros a cada dois minutos para facilitar a visualização.</i>	<i>146</i>
<i>Figura 57: Comparação entre os espectros de extinção das cit-AuNPs após a adição de diferentes volumes de NaX 1molL⁻¹, 50 µL (a), 100 µL (b) e 150 µL (c).</i>	<i>147</i>

<i>Figura 58: Imagem óptica de MHCE (a), imagem hiperespectral de MHCE (b) e espectro de espalhamento para uma amostra de cit-AuNP agregada com NaCl.</i>	<i>148</i>
<i>Figura 59: Esquema ilustrando o mecanismo SERS, retirado da referência ¹⁸⁷</i>	<i>153</i>
<i>Figura 60: Momentos de transição de dipolo e termos de acoplamento Herzberg-Teller que ocorrem nos termos da Equação 39. ¹⁸⁸</i>	<i>160</i>
<i>Figura 61: Esquema das contribuições envolvidas no momento de transição de polarizabilidade considerando transições de transferência de carga partícula ligante, que surge com o acoplamento de Herzberg-Teller dos estados e^g, e^f, e^r e e^M.</i>	<i>165</i>
<i>Figura 62: Espectro de Massas do sobrenadante de uma suspensão de (A) cetona-AuNP e (B) cit-AuNP, após tratamento com 4-Mpy ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em (C) é mostrado o espectro de fragmentação do pico com razão massa/carga de 190.9.</i>	<i>172</i>
<i>Figura 63: Espectro SERS da cetona-AuNP não agregadas utilizando diferentes comprimentos de onda de excitação. A) 785 nm; B) 633 nm; C) 532 nm.</i>	<i>174</i>
<i>Figura 64: Equilíbrio cetona-enólica para ACDC.</i>	<i>175</i>
<i>Figura 65: Orbitais de fronteira para as diferentes conformações da ACDC na forma enólica.</i>	<i>176</i>
<i>Figura 66: Orbitais moleculares do sistema Au_{20}-enol</i>	<i>178</i>
<i>Figura 67: A) Estrutura otimizada B) representação do estado de transferência de carga para o sistema Au_{20}-enol. As superfícies ciano representam os buracos e as superfícies roxas representam os elétrons. C) Espectro eletrônico calculado.</i>	<i>180</i>
<i>Figura 68: A) Estrutura otimizada B) Representação do estado de transferência de carga para o sistema Au_{20}-citrato. As superfícies em ciano representam os buracos e as roxas, os elétrons. C) Espectro eletrônico calculado.</i>	<i>181</i>
<i>Figura 69: Espectro de extinção das cetona AuNP (A) e citAuNP (B). (C) Comparação entre o espectro SERS da cit-AuNP (topo) e cetona-AuNP (abaixo) em condição de agregação</i>	<i>182</i>
<i>Figura 70: Cinética de agregação da (A) cetona-AuNP e (B) cit-AuNP após adição de 4-Mpy $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. (C) Evolução temporal da absorvância no máximo da banda de acoplamento plasmônico para cit-AuNP (curva preta) e cetona-AuNP (curva vermelha)</i>	<i>186</i>
<i>Figura 71: Espectro SERS de suspensão de (A) cetona-AuNP e (B) cit-AuNP na presença de 4-Mpy $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com comprimento de onda de excitação de (a) 633 e (b) 785 nm.</i>	<i>187</i>

Figura 72: (A) Modelo de um cluster de Au ₁₄₀ com uma estrutura octaédrica. (B) Configurações de equilíbrio para SAMs de dodecanotiol em clusters de Au ₁₄₀ obtidas por dinâmica molecular: 350 K (esquerda) e 200 K (direita). (C) Esquema da estrutura de SAM em nanopartículas de alta curvatura superficial. ²²⁵	196
Figura 73: Equilíbrio tautomérico e cis-trans da Ditiooxamida.	203
Figura 74: Geometria otimizada (esquerda), HOMO (meio), LUMO (direita) calculados para a Dto na forma cis (A) e trans (C). Diagrama de orbitais moleculares calculados para a forma cis (B) e trans (D).	206
Figura 75: Espectro Raman teórico pra a dto nas formas cis (curva preta) e trans (curva vermelha), calculado por DFT.	207
Figura 76: Estruturas de partida utilizadas na modelagem do sistema Au ₂₀ Dto (acima). Estruturas otimizadas para o sistema Au ₂₀ Dto (abaixo).	209
Figura 77: (A) geometria otimizada, (B) diagrama de orbitais moleculares, (C) HOMOs e (D) LUMOs para o complexo Au ₂₀ -transDto-P.	211
Figura 78: (A) geometria otimizada, (B) diagrama de orbitais moleculares, (C) HOMOs e (D) LUMOs para o complexo Au ₂₀ -transDTo-F.	212
Figura 79: (A) Comparação entre os espectros Raman teóricos da transDto e do complexo Au ₂₀ -transDto-P. (B) Comparação entre os espectros Raman teóricos da cisDto e do complexo Au ₂₀ -cisDto-P.	215
Figura 80: Comparação entre os espectros Raman calculados para os complexos Au ₂₀ -cisDto-P (curva vermelha), Au ₂₀ -transDto-P (curva preta) e Au ₂₀ -transDto-F (curva verde).	219
Figura 81: Cinéticas de troca de agregação das cit-AuNPs em diferentes concentrações de Dto. (A) 10 ⁻³ molL ⁻¹ , (B) 10 ⁻⁴ molL ⁻¹ e (C) 10 ⁻⁵ molL ⁻¹ .	221
Figura 82: Variação da absorbância da banda em 800 nm com o tempo para a reação de Cit-AuNp com dtox 10 ⁻³ molL ⁻¹ a 25°C. (A) 0 a 5500 segundos e (B) ampliação da região de 0 a 30 segundos.	222
Figura 83: Evolução temporal, de 0 a 60 min, do espectro SERS adquirido para suspensões de Cit-AuNp depois da adição de ditiooxamida (A) 10 ⁻³ molL ⁻¹ e (B) 10 ⁻⁴ molL ⁻¹ . λ _{exc} = 785 nm. (C) Representação da reação na superfície do ouro.	223
Figura 84: Espectro SERS das cit-AuNP após adicionada solução de dto 10 ⁻⁵ molL ⁻¹ . λ _{exc} = 785 nm.	226
Figura 85: Espectro SERS de uma suspensão de cit-AuNP após a adição de dto 10 ⁻³ molL ⁻¹ , utilizando comprimento de onda de excitação de 633nm.	228

<i>Figura 86: Evolução temporal da banda em 466 cm^{-1} do espectro Raman de uma suspensão de cit-AuNP com dto a 10^{-3} molL^{-1}, adquirido com λ_{exc} de 785 nm.</i>	<i>229</i>
<i>Figura 87: (A) Espectro eletônico da reação de cit-AuNP com dto (10^{-3} molL^{-1}) a 268.15K. (B) Evolução temporal da absorção em 800 nm.</i>	<i>230</i>
<i>Figura 88: (A) Curvas cinéticas linearizadas para a reação entre cit-AuNP e dto (10^{-3} molL^{-1}) em diferentes temperaturas. (B) Cálculo dos parâmetros de ativação utilizando a equação de Eyring.</i>	<i>233</i>
<i>Figura 89: Cálculo dos parâmetros de ativação para a reação de cit-AuNP com dto (10^{-4} molL^{-1})</i>	<i>234</i>
<i>Figura 90: Representação do mecanismo de troca de ligantes na superfície das cit-AuNP.</i>	<i>235</i>
<i>Figura 91: Espectros de extinção de suspensões de ceto-AuNP tratadas com dto: (A) 10^{-3} molL^{-1} e (B) 10^{-4} molL^{-1}</i>	<i>236</i>
<i>Figura 92: Variação da absorbância em 900 nm para uma suspensão de ceto-AuNP após a adição de dto 10^{-4} molL^{-1}. (A) 0 A 1800 segundos e (B) de 0 a 400 segundos.</i>	<i>237</i>
<i>Figura 93: Evolução temporal da absorbância em 900 nm para uma solução de ceto-AuNP com dto 10^{-3} molL^{-1} em diferentes temperaturas.</i>	<i>238</i>
<i>Figura 94: Evolução temporal, de 0 a 60 min, do espectro SERS adquirido para suspensões de Ceto-AuNP depois da adição de ditiooxamida (A) 10^{-3} molL^{-1} e (B) 10^{-4} molL^{-1}. $\lambda_{\text{exc}} = 785\text{ nm}$</i>	<i>239</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Dados do planejamento fatorial 2^4</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 2: Modificações das condições experimentais utilizadas no planejamento fatorial dos experimentos</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 3: Valores de diâmetro médio (d) e seu desvio padrão(σ) e razão de aspecto (r_a) AuNP sintetizadas no planejamento fatorial.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 4: Valores dos efeitos de cada fator nas respostas do sistema.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 5: Valores de λ_{max} observados nos espectros de extinção e espalhamento da AuNP.....</i>	<i>133</i>
<i>Tabela 6: Contagem de partículas a partir da decomposição dos canais RGB das imagens hiperespectrais para as diferentes AuNP.</i>	<i>138</i>
<i>Tabela 7: Valores de largura de banda a meia altura (w) e tempo de vida (T_2) calculados para as diferentes partículas a partir da aproximação lorentziana.</i>	<i>141</i>
<i>Tabela 8: Tabela dos valores calculados de λ_{max} (X_c), w e T_2 para amostra preparadas a partir de uma suspensão de AuNP contendo TMT 10^{-5} molL⁻¹.....</i>	<i>142</i>
<i>Tabela 9: Polarizabilidade calculada para o sistema Au₂₀-enol e para o enol livre</i>	<i>178</i>
<i>Tabela 10: Atribuição tentativa dos modos normais da ACDC, coordenada na superfície das ceto-AuNP, feita com base nos cálculos teóricos.....</i>	<i>183</i>
<i>Tabela 11: Resumo dos tipos de interações metal-ligante e suas características.</i>	<i>200</i>
<i>Tabela 12: Valores de energia dos orbitais de fronteira para os diferentes sistemas considerados.</i>	<i>213</i>
<i>Tabela 13: Valores calculados para os componentes do tensor de polarizabilidades para os diferentes sistemas envolvendo a Dto.</i>	<i>214</i>
<i>Tabela 14: Atribuição dos modos normais calculados para os sistemas transDto, Au₂₀-transDto-P e Au₂₀-trans Dto-F.....</i>	<i>215</i>
<i>Tabela 15: Atribuição dos modos normais calculados para os sistemas cisDto e Au₂₀-cisDto-P.</i>	<i>216</i>
<i>Tabela 16: Fatores de intensificação para o mecanismo químico não ressonante do Efeito SERS.....</i>	<i>220</i>

SUMÁRIO

1	Apresentação da Tese	23
2	Introdução	26
2.1	Cor	27
2.2	Cor de Nanopartículas de Ouro	30
2.3	Química de Coordenação de Nanopartículas de Ouro	33
3	Materiais e Métodos	42
3.1	Métodos	43
3.1.1	Espectroscopia Eletrônica	43
3.1.2	Espectroscopia Vibracional.....	43
3.1.3	Espectrometria de Massas	43
3.1.4	Espalhamento de Luz Dinâmico.....	44
3.1.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	44
3.1.6	Microscopia Hiperespectral de Campo Escuro (MHCE)	45
3.1.7	Análise de Imagens em Tempo Real – MasterView	48
3.1.8	Detalhes Computacionais.....	49
3.1.9	Reagentes	50
4	Estudo dos Mecanismos de Formação de Nanopartículas de Ouro	52
4.1	Introdução	53
4.1.1	Cristalização e Crescimento de Nano cristais	53
4.1.2	Síntese de Nanopartículas de Ouro	63
4.2	Parte Experimental	69
4.3	Resultados e Discussões	72
4.3.1	Síntese de AuNP: Caracterização Morfológica	72
4.3.2	Estudos Cinéticos do Mecanismo de Formação de AuNP	84
4.3.3	Caracterização da cit-AuNP e ceto-AuNP	99
4.4	Conclusões.....	103
5	Propriedades Ópticas de Nanopartículas de Ouro	105
5.1	Introdução	106
5.1.1	Ressonância Plasmônica de Superfície.....	106
5.1.2	Tempo de Vida dos Plasmons.....	112
5.1.3	Acoplamento Plasmônico	115
5.2	Parte Experimental	119

5.3	Resultados e Discussão	120
5.3.1	Ressonância Plasmônica de Superfície	121
5.3.2	Tempo de Vida dos Plasmons	139
5.3.3	Acoplamento Plasmônico	142
5.4	Conclusões	148
6	Química de Coordenação de Superfície de Nanopartículas de Ouro: O quarto papel do citrato	150
6.1	Introdução.....	151
6.1.1	Química de Coordenação de AuNP e o Efeito SERS.....	151
6.1.2	A teoria da Intensidade do Espalhamento Raman.....	154
6.1.3	A Teoria Unificada do Efeito SERS.....	162
6.2	Parte Experimental	170
6.3	Resultados e Discussão	171
6.3.1	Caracterização da Superfície das AuNPs.....	171
6.3.2	Cinética de Troca de Ligantes na Superfície das AuNPs.....	184
6.4	Conclusões	188
7	Química de Coordenação de Superfície: Cinética de Troca de Ligantes	190
7.1	Introdução.....	191
7.1.1	Monocamadas Auto-Organizadas em Superfícies	191
7.1.2	SAMs como Camadas Superficiais de Nanopartículas	194
7.1.3	Termodinâmica e Equilíbrio de Formação em Complexos de Metais de Transição	196
7.2	Parte Experimental	201
7.2.1	Estudo teórico	201
7.2.2	Purificação da Ditiooxamida	202
7.2.3	Funcionalização das AuNP	202
7.3	Resultados e Discussão	203
7.3.1	Estudo teórico da interação entre Dto e AuNP.....	204
7.3.2	Cinética de Troca de Ligantes na superfície das Cit-AuNP	220
7.3.3	Cinética de Troca de Ligantes na Superfície das ceto-AuNPs	235
7.4	Conclusões	240
8	Considerações Finais.....	242
9	Referências	247
10	Apêndice	266

10.1	Controlador de Temperatura	267
10.2	Figuras	274
11	Anexos	282
11.1	Dupla Camada elétrica	283
11.2	Súmula Curricular	285
11.3	Trabalhos e Colaborações	288

1 Apresentação da Tese

Superfícies podem ser tratadas como um quarto estado da matéria apresentando um grande gradiente de propriedades. Átomos e moléculas na superfície de um material experimentam ambientes diferentes das do seio do material ou da solução, apresentando diferentes valores de energia livre, estados eletrônicos, reatividades, mobilidades e estruturas.

Em materiais comuns, a estrutura como um todo determina a maioria das propriedades como condutividade elétrica, iônica e térmica, dureza e plasticidade. Porém em escala nanométrica as propriedades físicas e químicas dependem, em grande parte, das características da superfície e da sua interface, uma vez que a porcentagem de átomos na superfície cresce à medida que o tamanho das partículas diminui.

Os sítios de coordenação dos átomos da superfície não estão completos, permitindo a ligação de espécies doadoras-receptoras, ou ligantes. A afinidade de nanopartículas de ouro a ligantes tiolados, por exemplo, sugere uma similaridade com a química de coordenação do correspondente íon metálico. Dessa forma, os conceitos clássicos de química de coordenação podem ser estendidos para nanopartículas de metais de transição, desvendando a natureza das interações na interface partícula-molécula.

Uma vez que a aplicação eficiente de nanopartículas metálicas em diferentes sistemas envolve a comunicação das mesmas com moléculas em sua superfície, o estudo das propriedades espectroscópicas de nanopartículas funcionalizadas com ligantes, a interação destes com o ambiente químico ao seu redor, a elucidação dos processos de transferência de elétrons e/ou de energia entre as espécies envolvidas são de suma importância. Portanto, os estudos desenvolvidos têm como objetivo principal o avanço no nosso entendimento sobre esses processos.

Para isso, buscou-se estudar como variações no método de síntese influenciam as propriedades físicas, químicas e físico-química de nanopartículas de ouro, tais como, morfologia, propriedades ópticas, estabilidade, carga superficial, natureza das moléculas adsorvidas, reatividade superficial e labilidade. Usou-se esses resultados para manipular a coordenação de

ligantes nas nanopartículas. Ampliou-se o conhecimento em relação aos processos interfaciais em nanopartículas, visando a criação de materiais mais reprodutíveis, sensíveis e específicos.

2 Introdução

2.1 Cor

A cor é um fenômeno físico e psicológico relacionado a percepção do sistema ocular do ser humano e, sua natureza é associada ao comportamento da luz. Portanto, o entendimento das cores passa pela compreensão sobre as propriedades da luz, como por exemplo do que é formada, como se propaga e como é gerada.

Em um trabalho sobre a teoria da luz e das cores, publicado em 1672, Isaac Newton discute princípios da óptica geométrica baseados na teoria corpuscular da luz. Nele Newton chega à conclusão que a luz é constituída de uma “mistura heterogênea de raios com diferentes refrangibilidades”, ao observar que quando a luz solar passava através de um prisma a imagem formada no anteparo não era circular, como a fonte de luz utilizada, e apresentavam diferentes cores. Cada raio constituinte do feixe de luz branca era difratado de forma diferente pelo prisma dando origem as cores. Newton observou que os raios mais difratados exibiam a cor violeta e os menos, a cor vermelha.^{1,2}

Alguns anos depois, em 1678, surge a teoria ondulatória da luz no livro de Christiaan Huygens intitulado o “Tratado sobre a luz”.³ Nele Huygens explica o fenômeno de refração observado por Newton segundo um modelo baseado na luz como uma onda. No século XIX, com o desenvolvimento da teoria de interferência e difração de Thomas Young e Augustin Fresnel, da teoria das ondas eletromagnéticas de Maxwell e dos experimentos de Hertz, comprovou-se que a luz é uma onda eletromagnética. Juntamente com o conceito de quanta introduzido por Planck e de fóton introduzido por Einstein, no século XX, foi possível entender que a luz é formada por partículas com energia quantizada e que apresentam propriedades ondulatórias.

Dessa forma a observação de Newton ganhou uma nova interpretação, na qual a luz é constituída de partículas sem massa, os fótons, que apresentam diferentes energia, e devido a

essa diferença cada partícula propaga em uma direção, e cada fóton é relacionado a uma onda eletromagnética de diferente frequência.

Portanto a cor pode ser definida como sendo a impressão visual gerada por ondas eletromagnéticas de determinado comprimento de onda, ou seja, fótons com determinadas energias. E o conjunto de comprimentos de onda no qual as cores são visíveis para o olho do ser humano é denominado espectro visível, abrangendo a faixa de 380 a 780 nm. As radiações de comprimentos de onda de 380 e 780 nm, por exemplo, correspondem às cores violeta e vermelha, respectivamente.⁴ Na Figura 1 é mostrado o espectro eletromagnético como um todo e em destaque o espectro visível pelo olho Humano.

Figura 1: Espectro Eletromagnético, com destaque para a região do visível.

A nossa percepção de cor se dá a partir, primeiramente, pela interação da luz com a matéria através dos processos de reflexão, refração, difração, espalhamento, interferência e absorção. Os quatro primeiros processos estão relacionados as propriedades físicas dos materiais como índice de refração e constante dielétrica. O fenômeno de interferência ocorre devido a interação de diferentes ondas eletromagnéticas. Já a absorção está correlacionada com a troca de energia entre a radiação e o material, ou seja, envolve a assimilação dos fótons pela matéria.

Corpos que refletem balanceadamente em todo espectro visível são vistos como brancos pelo observador. Já corpos que absorvem todo o espectro visível são vistos como pretos. Dessa forma o branco e preto não podem ser considerados cores e sim a presença e a ausência de todas, respectivamente. Em contra partida, objetos que refletem ou absorvem luz em um intervalo

limitado de comprimentos de onda do espectro visível exibem alguma cor. Por exemplo, objetos vermelhos refletem os comprimentos de onda referente ao vermelho (maiores do que 650 nm) e absorvem os demais (verde e azul).

De acordo com a estrutura do olho humano todas as cores são vistas como combinações de três cores, tidas como primárias, vermelho, verde e azul. Para efeito de padronização a Comissão internacional de Iluminação (CIE - *Comission Internationale de l'Eclairage*) definiu como comprimento de onda para as cores primárias os valores de 435.8, 546.1 e 700 nm para o azul, verde e vermelho respectivamente. ⁴

As demais cores podem ser formadas a partir das cores primária por dois processos: a mistura aditiva e a subtrativa. Na mistura aditiva ocorre o somatório dos comprimentos de onda e um objeto que reflete comprimentos de onda no verde e vermelho, por exemplo, devido ao processo de interferência entre as ondas, é visto com uma cor amarela, Figura 2.^{5,6}

Figura 2: Processo de formação das cores através da mistura aditiva (acima) e subtrativa (abaixo).

Na mistura subtrativa ocorre o processo de absorção de parte da luz, de forma que corantes ou pigmentos atuam como filtros seletores de luz, absorvendo determinados

comprimentos de onda, devido à excitação de seus elétrons pela interação com a radiação eletromagnética, Figura 2.^{5,6}

Dessa forma, o modelo matemático adequado para a representação espectral da cor é um espaço vetorial de dimensão finita. O modelo tricromático de Young-Helmholtz utiliza as faixas de vermelho (red - R), verde (green - G) e azul (blue - B) em um espaço vetorial tridimensional. O espaço RGB é, portanto, representado por um cubo denominado “cubo das cores”, no qual a intensidade de cada componente varia de 0 a 255. Os vértices do cubo representam as cores primárias e secundárias aditivas, com exceção do vértice (0,0,0) e (255,255,255) que representam o preto e o branco, respectivamente, e na diagonal estão os tons de cinza. Qualquer ponto no interior do espaço de cores é resultado da combinação das três cores primárias.⁴

Figura 3: Cubo de cores para o espaço RGB.

2.2 Cor de Nanopartículas de Ouro

A cor de nanopartículas, embora sem essa conotação dimensional, intriga a humanidade há séculos. O primeiro relato de objeto com nanopartículas de ouro data do século IV a. C, o Cálice de Licurgo. Fabricado pelos romanos, é constituído de partículas de ouro e prata em uma matriz

de vidro, que ao ser iluminado externamente enxerga-se uma coloração amarela-esverdeada, devido aos processos de espalhamento de luz. Já ao ser iluminado por dentro do cálice, enxerga-se a luz transmitida e com ela uma coloração vermelha, característica de nanopartículas de ouro,

Figura 4

Figura 4: Cálice de Licurgo

Devido à suas cores, nanopartículas de ouro prata e cobre foram amplamente utilizadas na Idade Média na fabricação de vidros coloridos para decoração de vitrais de igrejas. Porém o estudo propriamente dito de partículas de ouro tem início no século XIX, quando Michael Faraday realizou a síntese destas utilizando fósforo como agente redutor e disulfeto de carbono como solvente e estabilizante. Mesmo sem uma caracterização precisa, Faraday sugeriu que as variações no tamanho das partículas teriam influência na coloração das mesmas.⁷

Porém apenas na década de 1950, com o advento de técnicas de microscopia de alta resolução, como por exemplo, a microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de tunelamento, que o estudo de nanopartículas começou a ganhar espaço na ciência. Na década de 1950, Turkevich, Stevenson e Hillier realizaram o primeiro estudo que racionalizou a síntese de nanopartículas de ouro em meio aquoso.^{8,9} Através da redução do ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) com citrato de sódio em meio aquoso, altas temperaturas e sob vigorosa agitação eles mostraram que o tamanho, conseqüentemente a cor, das partículas dependiam da concentração de reagentes e da temperatura.

A partir desse estudo surgiram inúmeros métodos de síntese capazes de controlar o tamanho, forma e composição das nanopartículas. Dentre eles destacam-se os métodos utilizando matrizes poliméricas e método mediado por sementes. No primeiro utiliza-se polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizante e citrato de sódio, PVP ou etilenoglicol como agentes redutores.¹⁰ Já no método mediado por sementes utiliza-se micelas de brometo de cetiltrimetilamônio como molde para o crescimento de nanopartículas pré-sintetizadas de 3 nm.^{11,12}

Portanto sabe-se que a cor de nanopartículas metálicas está relacionada ao seu tamanho e forma. Porém qual é a origem física dessas cores?

Como discutido na seção anterior nossa percepção de cor vem dos processos de interação da luz com a matéria. As interações de metais com campos eletromagnéticos podem ser descritas classicamente utilizando as equações de Maxwell, mesmo nanoestruturas com dimensões menores que o comprimento de onda da radiação podem ser descritas classicamente.

Como sabemos de nossa experiência cotidiana superfícies metálicas são altamente refletoras em toda região do espectro eletromagnético visível, adquirindo uma coloração prateada. Nessas condições uma aproximação de um condutor perfeito com uma condutividade finita fixa é válida para a maioria das aplicações. Contudo, para radiações de maiores frequências, na faixa do ultravioleta, os metais adquirem um caráter dielétrico, permitindo a propagação de ondas eletromagnéticas em seu interior, porém, com diferentes graus de atenuação dependendo da sua estrutura eletrônica.

Essas propriedades dispersivas podem ser descritas por uma função dielétrica complexa em função da frequência da radiação incidente $\epsilon(\omega)$. Em uma ampla faixa de frequências, as propriedades dos metais podem ser descritas através do modelo de plasma, onde considera-se um gás de elétrons livres de densidade finita movendo-se sobre os núcleos positivos fixos. Nesse modelo, os elétrons oscilam em resposta ao campo eletromagnético aplicado e seu movimento é amortecido devido às colisões elétron-elétron e elétron-núcleo. Resolvendo a equação de

movimento para o plasma de elétrons livres, obtém-se a constante dielétrica apresentada na Equação 1. Na qual, ω_p é a frequência natural de oscilação do plasma de elétrons, descrita em função da densidade de elétrons (n), da massa dos mesmos (m) e da constante dielétrica do meio (ϵ_0).¹³

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

$$\omega_p^2 = \frac{ne^2}{\epsilon_0 m}$$

Equação 1

A partir da constante dielétrica pode-se calcular o índice de refração complexo dos metais como sendo: $\tilde{n} = n(\omega) + i\kappa(\omega) = \epsilon^{-1/2}$. Onde $n(\omega)$ descreve os processos de refração da luz e κ é o coeficiente de extinção, descrevendo os processos de absorção e espalhamento de ondas eletromagnéticas. A dependência de κ com a frequência da radiação incidente explica, por exemplo, por que apenas o ouro e cobre metálicos são de fato coloridos.

Portanto a cor dos metais está relacionada a resposta do mar de elétrons livres a um campo eletromagnético aplicado. Para nanopartículas a cor também é originada da interação da radiação com os elétrons livres, porém, deve-se levar em consideração que a dimensão das partículas é menor que o comprimento de onda da luz visível. Dessa forma, os processos de espalhamento e absorção da radiação apresentaram uma dependência com o tamanho das partículas. O tratamento mais detalhado será apresentado e discutido no Capítulo 5.

2.3 Química de Coordenação de Nanopartículas de Ouro

As propriedades diferenciadas de nanomateriais, principalmente em relação a interação da luz com os mesmos, têm grande impacto em diferentes áreas da ciência, englobando a química,

física, biologia, engenharia, medicina, dentre outras. O uso de nanopartículas em biomedicina,^{14–16} catálise, eletrocatalise,^{17–23} sensoriamento,^{24–29} fotônica, computação óptica,^{30–35} geração de energia,^{36–39} dentre outras, vêm crescendo constantemente e é de grande interesse da comunidade científica.

A aplicação das nanopartículas requer um controle fino de suas propriedades como tamanho, forma, composição e propriedades superficiais. A síntese de nanopartículas utiliza ligantes capazes de controlar a nucleação e o crescimento dos cristais, proporcionando estabilidade ao colóide. Tióis são os ligantes mais utilizados para essa finalidade pois adsorvem em superfícies metálicas formando monocamadas automontadas conferindo estabilidade à superfície e controlando suas propriedades químicas e físico-químicas. Além disso, o uso de ligantes pontes multifuncionais pode ser explorado na coordenação simultânea de metais de transição na superfície das partículas,^{24,25,40} estendendo os conceitos de química de coordenação para o design de novos materiais híbridos com propriedades supramoleculares, ópticas, químicas e físico-químicas diferenciadas.

A formação de uma forte ligação covalente entre o átomo de enxofre e o metal diminuem a energia livre superficial das nanopartículas e, as interações intermoleculares previnem a agregação, conferindo estabilidade às nanopartículas. Já as características dos grupos terminais na interface molécula/solvente determinam as propriedades físico-químicas e a reatividade superficial das partículas e, sendo mais acessível a técnicas experimentais, suas características e propriedades são mais bem conhecidas e controladas. Em contrapartida a natureza e a estrutura das interações metal-ligante na interface molécula-partícula ainda não foram completamente elucidadas. Contudo esse conhecimento é crucial para a aplicação eficiente das nanopartículas nas diferentes áreas.

Em busca de um entendimento mais completo acerca das propriedades interfaciais de nanopartículas funcionalizadas e suas aplicações, diversos grupos de pesquisas vêm

desenvolvendo estudos teóricos e experimentais. Dentre os estudos teóricos a utilização de Teoria do Funcional de Densidade independente do tempo (DFT) e dependente do tempo (TD-DFT) vem se destacando no entendimento das propriedades dos estados fundamental e excitados de sistemas envolvendo pequenos clusters metálicos e moléculas orgânicas simples, como piridina e bezenotiol e seus derivados.⁴¹⁻⁴⁵

O principal foco desses trabalhos tem sido o estudo das alterações das propriedades moleculares, como estrutura eletrônica, polarizabilidade e distribuição de cargas, devido a interações entre os estados fundamentais da estrutura metálica e do ligante; e a existência de transferências de elétrons entre a nanoestrutura metálica e os ligantes, bem como a distribuição dos carregadores de cargas negativas (elétrons) e positivas (buracos) no estado excitado. A compreensão de tais propriedades é de vital importância para aplicações de nanopartículas em fotocatalise, por exemplo, onde as propriedades do estado excitado definem a eficiência da catálise; e em estudos de efeitos como o espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS), no qual variações de polarizabilidade e a existência de transições eletrônicas definem a magnitude da intensificação do sinal Raman.

Schatz, Jensen e Zhao discutem a natureza da interação metal-ligante em nanopartículas com base nas interações dos orbitais de fronteira, chegando a conclusões em relação as forças de ligação, com base na existência de sistemas π de simetria adequada para a existência de retrodoação, e suas consequências no espectro Raman do sistema como um todo.^{43,46,47} Lombardi e Birke também consideram as interações entre os orbitais moleculares, porém a partir da simetria dos mesmos concluíram que deve ocorrer um acoplamento entre os níveis eletrônicos e vibracionais dos complexos para que as diferenças de polarizabilidade e de intensidade dos modos vibracionais sejam explicados.^{48,49}

Hongxing Xu apresenta um método interessante de visualização das densidades de cargas no estado excitado baseado na diferença de densidade eletrônica entre os estados excitados e o

estado fundamental.⁵⁰ Dessa forma, mostraram que quando há transições de transferência de carga ligante-metal os elétrons se concentram nas extremidades do cluster metálico enquanto que os buracos estão localizados preferencialmente no HOMO dos ligantes.

Esses trabalhos representam um grande avanço no entendimento das propriedades dos compostos formados na superfície de nanopartículas, porém, o foco tem sido restrito às propriedades espectroscópicas de sistemas pequenos utilizando moléculas modelos. Do ponto de vista de química de coordenação, há pouco entendimento das características dos complexos formados na superfície de nanopartículas, principalmente em relação as propriedades ácido-base e da labilidade dos ligantes coordenados à superfície. Uma vez que a criação de nanopartículas funcionais envolve sucessivas etapas de reações superficiais, o entendimento de tais propriedades, do ponto de vista de química de coordenação, é crucial para aplicação das mesmas.

Experimentalmente, o estudo da natureza dos complexos superficiais é um tópico desafiador, uma vez que poucas técnicas são capazes de fornecer informações diretas a respeito da interação metal-ligante em superfícies metálicas. Além disso, a complexidade da análise dos dados e a falta de reprodutibilidade são problemas constantemente enfrentados na caracterização das propriedades dos complexos formados. Dessa forma, muitos trabalhos se concentram principalmente na síntese e caracterização das NPs, faltando uma discussão mais detalhada a respeito das naturezas das interações e das propriedades do sistema.

Contudo, mesmo não havendo um consenso geral sobre a interação metal-ligante em nanopartículas, existem inúmeros protocolos para funcionalização e aplicação de nanopartículas. Em um artigo de revisão Beloglazkina e colaboradores⁵¹ mostram diferentes métodos de funcionalização de nanopartículas de ouro com ligantes apresentando grupos multifuncionais (fluorófilos, cromóforos, receptores, ativos eletroquimicamente) ligados a um grupo tiol; e sua aplicação em sensores e catalisadores. Nele os autores agrupam os métodos de modificação de

NPs em dois tipos: por troca de ligantes na superfície e por modificação de um já existente na superfície.

A primeira abordagem consiste em substituir o ligante já existente na superfície das partículas por diferentes ligantes, que apresentam a atividade desejada. Portanto a labilidade do ligante presente na superfície influenciará a cinética de troca de ligantes e, consequentemente, a estrutura do complexo final. Dessa forma é preferível a utilização de nanopartículas lábeis, normalmente sintetizadas pelo método de Turkevich, através da redução de um sal de ouro com citrato de sódio.

O segundo método consiste em utilizar as nanopartículas como plataformas para realização de reações orgânicas convencionais, gerando grupos terminais com a funcionalidade desejada. Em ambos os métodos deve-se levar em consideração a estabilidade do colóide durante todo processo de funcionalização, evitando a agregação das partículas, a diminuição do rendimento das reações e da atividade do ligante.

Apesar da grande variedade de métodos para funcionalização de nanopartículas, os efeitos da formação da ligação ligante-metal na estrutura eletrônica, atividade e reatividade das moléculas ainda é pouco conhecido. Vohlídal et al. tentam explicar o efeito da interação entre nanopartículas de prata e complexos de ferro(II) terpiridina nos níveis eletrônicos do complexo e, como essa perturbação altera o espalhamento Raman do sistema, em relação ao complexo de ferro isolado.⁵² Através do perfil de excitação do espectro Raman do complexo isolado e na superfície das nanopartículas de prata os autores mostram que não ocorre perturbação dos níveis eletrônicos do complexo, contudo nesse caso não há a formação de uma ligação covalente entre a terpiridina e a prata. Apesar de se tratar de apenas uma adsorção física, esse artigo mostra uma abordagem interessante para o estudo dos efeitos da interação na interface partícula-molécula.

Ferrer et. al mostraram que nanopartículas de ouro funcionalizadas com complexos de ferro(II) com derivados de terpiridina (tpy), Figura 5, apresentam uma separação de cargas de

tempo de vida longo, sob excitação utilizando um laser, e a natureza das espécies transientes depende do comprimento de onda de excitação. O autor propõe que com a excitação em 308 nm há a geração de espécies $[\text{Fe}(\text{tpyR})_2]^{+3}$ e $(\text{AuNP})^{-1}$, devido a transferência de um elétron do complexo de ferro para a nanopartículas de ouro, provavelmente mediada pela formação da ligação entre a terpiridina modificada e a superfície do ouro.⁵³ Adicionalmente, os autores mostram que essas cargas podem ser utilizadas para geração fotocatalítica de H_2 . Contudo, a origem exata do estado excitado e o efeito da coordenação na superfície do ouro não são conhecidos.

Figura 5: Funcionalização de AuNP com complexos de ferro(II) e derivados de terpiridina. Adaptado da referência ⁵³

Paine e colaboradores mostraram por XPS que a interação do ligante TPASH@C8, Figura 6, ocorre através da formação de ligações covalente entre as espécies Au^0 e S^{-1} . Os autores mostram um aumento da atividade catalítica dos complexos de ferro(II) formados na superfície das partículas funcionalizadas com TPASH de cerca de 8 a 10 vezes para reações de decarboxilação do benzilformiato,⁵⁴ além disso, observaram um aumento no número de ciclos catalíticos. Os autores justificam essas mudanças apenas em função do aumento da área superficial e da auto-organização dos complexos na superfície do ouro, o que facilitaria o acesso do substrato ao sítio

ativo do complexo, deixando de lado os efeitos da interação eletrônica entre as nanopartículas e o complexo.

Scheme 2. Functionalization of gold nanoparticles with N_4 ligand and iron complexes.

Figura 6: Funcionalização de AUNP com ligante TPASH e complexos de ferro.

Outro efeito interessante observado a partir da interação entre nanopartículas de ouro e complexos superficiais é a alteração das propriedades magnéticas de complexos de disprósio utilizando tiocianato como ligantes pontes. Habib et al. comprovaram por medidas de magnetização que não há mudanças significativas das propriedades magnéticas do complexo livre e na superfície das AuNPs, quando aplicado um campo contínuo. Porém, as propriedades magnéticas dinâmicas, quando aplicado um campo alternado, mudam drasticamente.⁵⁵ Contudo, a explicação é somente devido a mudanças na anisotropia local dos complexo, e não foram explorados aos efeitos da influência da nanopartículas de ouro nas propriedades do complexo.

Li et al. mostraram uma alteração no perfil de fluorescência de porfirinas, base livre e metaladas, coordenadas à superfície de nanobastões de ouro, porém não chegaram em nenhuma conclusão sobre a causa da alteração.⁵⁶ Scaiano et al. discutem os efeitos da interação entre

nanoestruturas metálicas e ligantes com base em três mecanismos: o aumento de geração de estados excitados, transferências de pares elétrons buracos e o aquecimento local, causado pela interação da nanoestrutura com a luz. Os dois primeiros mecanismos estão diretamente correlacionados com o grau de sobreposição dos estados eletrônicos da nanoestrutura e do ligante, ou seja, com o grau de covalência da interação entre os mesmos.^{19,57}

Os exemplos dados evidenciam a exploração de diferentes propriedades de moléculas e complexos na superfície de nanopartículas, tais como propriedades espectroscópicas, fotoquímicas, magnéticas e catalíticas, no entendimento da natureza e do efeito das interações na interface partícula-molécula. Contudo as conclusões ainda não são concretas e algumas de natureza especulativa. Isso mostra a necessidade de um entendimento mais fundamental a respeito da natureza das interações na superfície das nanopartículas, revisitando conceitos clássicos de química de coordenação, espectroscopia, química analítica, fotoquímica e fotofísica e, aplicando-os no estudo da influência que um ligante causa na superfície das partículas e vice-versa.

Portanto o estudo mais aprofundado de moléculas simples facilita a aplicação e ampliação de conceitos clássicos para o entendimento da química de coordenação de nanopartículas. Com isso, estudos envolvendo sistemas mais complexos, para diferentes tipos de aplicações, poderiam ser planejados de maneira mais consciente e com maior eficiência.

Como foi apresentado nas seções anteriores a aplicação de nanopartículas passa pelo entendimento de suas características morfológicas, como tamanho, forma e composição; propriedades ópticas, relacionadas a sua interação com a luz; e propriedades químicas, dependentes das interações nas interfaces ligante-metal e ligante-solvente. Portanto, faz-se necessário um ajuste fino dos processos sintéticos e de funcionalização, aliados a um melhor entendimento das propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos sistemas.

Tendo isso em mente, esta tese tem como objetivo um estudo aprofundado do sistema nanopartículas-ligante como um todo, abordando desde a síntese de nanopartículas e sua caracterização até as propriedades superficiais como: natureza das ligações metal-ligante, labilidade dos complexos e mecanismos de reações de troca de ligantes na superfície das partículas. Procurou-se aliar técnicas experimentais com um detalhado estudo teórico. Dessa forma, a síntese e caracterização morfológica das partículas foram realizadas utilizando um planejamento fatorial de experimentos e uma análise estatística dos resultados, possibilitando um entendimento mais amplo e um melhor controle dos processos de nucleação e crescimento das partículas. Para caracterização das propriedades ópticas das nanopartículas foram combinadas técnicas de microscopia e espectroscopia, como microscopia hiperespectral de campo escuro e espectroscopia eletrônica, possibilitando o estudo das propriedades ópticas de nanopartículas isoladas e em dispersão. Já a caracterização da interação metal-ligante na superfície das partículas foi realizada por espectrometria de massa e espectroscopia Raman, juntamente com uma modelagem teórica dos sistemas.

Com um estudo de todas etapas, desde a síntese até a funcionalização das partículas, foi possível mostrar que além de controlarem o tamanho e forma das partículas, os parâmetros de síntese podem controlar as propriedades químicas de suas superfícies e o tipo de complexo formado. As alterações de tais propriedades levam a diferentes mecanismos para as reações de troca de ligantes na superfície das partículas, modificando as propriedades das partículas funcionalizadas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Métodos

3.1.1 Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos e de extinção foram obtidos com um espectrofotômetro com detector de rede de diodos da marca Hewlett Packard modelo 8453A para estudos na região de 190 a 1100 nm, utilizando cubetas de quartzo de duas faces com caminho ótico de 1,0 cm.

Para espectros na região do visível e infravermelho próximo foi utilizado um espectrofotômetro de fibra óptica Field Spec da AnalyticalSpectralDevices (ASD), equipado com uma lâmpada de tungstênio.

3.1.2 Espectroscopia Vibracional

Para espectros Raman e SERS foi utilizado um espectrômetro com fibras ópticas, portátil da marca In Photonics modelo INP-AA-78ZZ, com laser de diodo de comprimento de onda de 785 nm na faixa de 2000 a 350 cm^{-1} , potência máxima de 100 mW. E um microscópio Raman confocal the WITec, equipado com laser de Ar, Nd:YAG e He-Ne, foi usado para aquisição de espectro SERS utilizando comprimento de onda de excitação de 488, 532 e 633 nm, respectivamente, com potências variando na faixa de 0.1 a 40 mW.

3.1.3 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram adquiridos utilizando o espectrômetro Bruker Daltonics MicroTOF Esquire 3000 Plus no modo positivo, capilaridade de 400V, nebulizador com 12 psi de pressão, fluxo de gás de 5L/min e uma temperatura de 320 °C.

3.1.4 Espalhamento de Luz Dinâmico

Os histogramas de distribuição de tamanho das partículas foram registrados em um equipamento que mede o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) modelo Nanotrak 252 da Microtrac, operando com configurações do tipo heterodyne e com sensibilidade entre 0,8 nm e 6,0 μm .

Tais medidas são capazes de aferir a distribuição de tamanho das partículas, sendo que o raio medido é o raio de cisalhamento.

3.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram preparadas por *drop casting* de suspensões de nanopartículas, sem diluição, sobre vidro condutor, e secadas sob vácuo. As imagens foram realizadas utilizando um microscópio com emissão de campo da marca JEOL, modelo 7200. As condições de aquisição das imagens estão apresentadas nas figuras e legendas das mesmas.

Os histogramas de distribuição de tamanho de partículas foram calculados a partir da medida de maior e menor eixo de 1000 partículas em dez imagens diferentes de cada amostra, utilizando o software Image J.

3.1.6 Microscopia Hiperespectral de Campo Escuro (MHCE)

Um sistema de ultra resolução da CytoViva, composto de um arranjo hiperespectral montado em um microscópio Olympus BX51, foi utilizado para registrar imagens de campo escuro e o espectro de espalhamento Rayleigh de nanopartículas isoladas.

A configuração de campo escuro gera um cone oco de luz, que é focado na amostra. Apenas a luz espalhada e difratada no interior do cone atinge a lente objetiva, que apresenta uma abertura numérica menor que a abertura numérica da lente condensadora. A ordem zero de difração da luz não é coletada, e as partículas aparecem como pontos coloridos em um fundo preto.

O poder de resolução do microscópio é limitado pela difração da luz. Contudo o sistema da CytoViva utiliza uma condensadora desenvolvida por Vainrub e colaboradores⁵⁸ que apresenta uma abertura angular que possibilita a coleta de maiores ordens de difração. Aumentando o poder de resolução para $\lambda/5$. A Figura 7 mostra o arranjo experimental do microscópio de campo escuro utilizado. Aliado com as propriedades ópticas das nanopartículas de ouro, esse sistema de ultra resolução permite a análise de nanopartículas isoladas em meio aquoso.

Figura 7: Esquema do microscópio hiperspectral de campo escuro.

Com essa configuração é possível registrar imagens ópticas, em uma ccd convencional (dage-X^L), compostas por um espectro de três canais RGB, com uma resolução espacial de 64 nm. Nessa imagem cada canal de cor (vermelho, verde ou azul) carrega a informação de uma faixa ampla de comprimento de onda, podendo haver sobreposição das faixas, como mostrado na Figura 8.

Adicionalmente é possível registrar uma imagem hiperspectral, utilizando uma ccd Specim, com resolução espacial de 64 nm e espectral de 1 nm, na qual cada pixel é constituído por um espectro de espalhamento na região 400 a 1000 nm. Nesse caso a imagem RGB é reconstruída utilizando o valor de apenas um comprimento de onda como entrada para cada canal de cor. Foram utilizados os comprimentos de onda de 465, 545 e 635 nm para os canais azul, verde e vermelho, respectivamente.

Como será discutido no Capítulo 5.3, essa característica dos diferentes tipos de imagens possibilita o processamento das imagens utilizando um procedimento de separação de cada canal RGB em uma imagem diferente. Dessa forma espécies que apresentam espectro de espalhamento

com intensidades diferentes nos comprimentos de onda utilizados para reconstrução da imagem hiperespectral podem ser estudadas separadamente. Esse tipo de processamento foi realizado utilizando o software Image J.

Figura 8: Faixa de composição de comprimentos de onda par cada canal de cor do espectro RGB.

O preparo das amostras para MHCE foi realizado pingando 1 μL de suspensão de nanopartículas de ouro diluídas pela metade em um vidro ultra limpo classe B NEXTERION® modificados com aminopropiltrimetoxisilano (APTS). Um *cover slip* ultra limpo da NEXTERION® foi colocado sobre a gota de forma que essa formasse um filme fino e homogêneo sobre o vidro. A amostra foi selada com fita adesiva e esmalte sem cor, para evitar a penetração de óleo durante a análise.

A modificação dos vidros ultra limpos com APTS foi realizada de acordo com o seguinte procedimento. Mergulharam-se lâminas de vidro ultra limpo classe B em uma solução 5 % (v/v) de APTS em CHCl_3 por 3 min. As lâminas de vidro modificadas foram então submetidas a 5 rápidos banhos sucessivos em béqueres contendo água ultra pura. A comprovação da silanização veio pela hidrofobicidade aparente. Os vidros foram sinterizados em estufa pré-aquecida a 180 $^{\circ}\text{C}$ por 2

horas. Após esfriar, passou-se um fluxo de nitrogênio guardou-se as lâminas em dessecador até o uso.

3.1.7 Análise de Imagens em Tempo Real – MasterView

As análises em tempo real das sínteses de AuNP foram realizadas utilizando o programa MasterView desenvolvido pelo Núcleo de Desenvolvimento de Processos e Análises Químicas em Tempo Real (NQTR) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.^{59,60}

Utilizando uma *webcam* convencional a luz refletida pelo sistema reacional é coletada, e o sinal gerado pela ccd da câmera é enviado para a placa de vídeo do computador. A partir desses sinais o programa reconstrói a imagem e armazena os valores médios dos canais do espectro RGB de cada frame em uma região espacial pré-determinada. Foram utilizados intervalos de tempo de um segundo entre cada aquisição de dados. Na Figura 9 é mostrada a interface gráfica do programa.

Figura 9: Interface gráfica do MasterView

Foi utilizada uma *webcam* modelo Philips SPC530NC/00. Para evitar erros devido a configurações automáticas da câmera as opções de auto controle de branco, controle da abertura

da lente, ganho e compensação de luz de fundo foram todas desabilitadas. Tais opções fazem com que haja um ajuste do balanço interno de cor da câmera automaticamente podendo fazer com que os valores de RGB co-variem linearmente ou não. Na Figura 10 são mostradas as configurações utilizadas para a *webcam*. A reação foi realizada em uma capela fechada com *insulfilm* e a iluminação foi controlada com um arranjo de leds.

Figura 10: Configuração da webcam

3.1.8 Detalhes Computacionais

A modelagem teórica foi realizada utilizando o software Gaussian 09, para Linux, instalado em um computador com processador Intel Core i7 de 3.2GHz de oito núcleos, 16 GB de memória RAM, DDR3, placa de vídeo GForce653M de 2GB e 125 GB de armazenamento em um HD de estado sólido. Para os cálculos das propriedades de moléculas orgânicas isoladas foi utilizado apenas 1 núcleo e 1500 MB de memória RAM. Já para os cálculos envolvendo os clusters de ouro foram utilizados 8 núcleos e 10GB de memória RAM.

Foi utilizado método de Teoria do Funcional de Densidade independente do tempo (DFT)⁶¹ para os cálculos das propriedades do estado eletrônico fundamental, como geometria, densidade eletrônica, orbitais moleculares e espectro vibracional. Para o cálculo das propriedades dos estados excitados foi utilizado o método de DFT dependente do tempo (TD-DFT). Sendo que para os ligantes livres foi utilizado o funcional B3LYP⁶²⁻⁶⁴ com conjunto de bases 6-311G++(d,p). Para o estudo dos modos de coordenação dos ligantes na superfície do ouro foi utilizado um cluster com vinte átomos de ouro com uma geometria tetraédrica com a finalidade de simular a face {100}. Os cálculos foram realizados utilizando o funcional BP86 com o conjunto de bases 6-311G++(d,p) para os átomos de C, H, N e S. Para os átomos de Au foi utilizada a base LanL2DZ com seus respectivos valores de pseudopotencial para os elétrons das camadas internas e correções para efeitos relativísticos presente nos átomos de ouro.⁶⁵ Para os cálculos de TD-DFT foram utilizadas as mesmas bases descritas acima e o cálculo foi restringido para os cinco primeiros estados excitados.

3.1.9 Reagentes

- Ácido Tetracloroáurico 99,9 % (HAuCl₄) – Aldrich
- Citrato de Sódio (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) – Carlo Erba
- Cloreto de Sódio (NaCl) PA ACS – Synth
- Ácido Clorídrico PA ACS (HCl) – Synth
- Ácido Nítrico 70 % PA ACS (HNO₃) – Synth
- 2,4,6-trimercapto-1,3,5-triazina - Aldrich
- CHCl₃ – Synth
- Aminopropiltrimetoxisilano (APTS) –Aldrich
- Mica – Ted Pella Inc.

- Vidro ultra limpo para microscopia NEXTERION glass B e cover slip - Schott

Todos reagentes foram utilizados como entregues, sem prévia purificação. Quando foi necessário purificar o reagente o procedimento será descrito na seção experimental do respectivo capítulo.

4 Estudo dos Mecanismos de Formação de Nanopartículas de Ouro

4.1 Introdução

4.1.1 Cristalização e Crescimento de Nano cristais

A Cristalização é definida como um processo de geração de uma fase sólida cristalina a partir de uma fase homogênea podendo ela ser uma solução, sólidos fundidos ou uma fase gasosa. Este processo envolve basicamente duas etapas, nucleação e crescimento. A etapa de nucleação consiste na geração de núcleos a partir dos monômeros, unidades básicas necessárias para iniciar a cristalização, no caso de partículas metálicas os monômeros seriam os átomos metálicos em solução. A segunda consiste no aumento de tamanho dos núcleos através da incorporação dos monômeros à superfície dos cristais, esse processo é basicamente controlado pela difusão dos monômeros na solução.⁶⁶

O método mais utilizado para formações de nano-cristais consiste na síntese química de cristais inorgânicos via processos coloidais, conhecidos como métodos *bottom-up*. Por questões didáticas os processos de nucleação e crescimento de nano-cristais por métodos coloidais podem ser separados em cinco etapas:⁶⁶

- I. Reações entre os precursores gerando o monômero de interesse. Por exemplo: a redução de um sal metálico por um agente redutor gerando átomos metálicos em solução;
- II. Interação entre os monômeros gerando clusters, ou núcleos, e início do crescimento destes. Essa etapa é reversível uma vez que as reações de dissolução dos núcleos e de formação dos mesmos apresentam a mesma ordem de grandeza de velocidades;
- III. Formação de clusters com um tamanho crítico, tornando o processo de crescimento irreversível;

- IV. Crescimento dos cristais controlado pela difusão dos monômeros no gradiente de concentração da dupla camada elétrica dos cristais. A combinação de agentes estabilizantes, solventes e condições experimentais controlam a cinética de crescimento;
- V. A última etapa consiste na interação entre os nanocristais formados na etapa anterior produzindo estruturas maiores. Tal processo é governado pelas interações partícula-partícula e partícula-solvente.

Do ponto de vista termodinâmico a formação dos cristais está relacionada à variação de energia livre durante as cinco etapas do processo. De fato o cristal irá crescer em um arranjo geométrico de forma a minimizar sua energia superficial. Na Figura 11 é representada a variação de energia livre para cada uma das 5 etapas de formação dos cristais em função do tamanho dos clusters. Nas etapas I e II o processo de cristalização é reversível, porém quando o tamanho crítico do cristal é atingido, a variação de energia livre é máxima. A partir desse ponto o crescimento se torna irreversível e as partículas tendem a adotar um tamanho e forma que minimizem sua energia livre.⁶⁶

Figura 11: Esquema da variação de energia livre de Gibbs durante as etapas de formação de nanocristais

Essa divisão em cinco etapas é válida somente para processos ideais e a maior dificuldade no controle de forma e tamanho de nanopartículas se dá na separação dos processos de nucleação e crescimento. Uma condição ideal de reação é apresentada na Figura 12, onde a etapa de nucleação em função de uma determinada condição experimental (temperatura, concentração de reagente, pH, tempo de reação, etc.) não se sobrepõe à etapa de crescimento. Essa condição é ideal pois nela o número de núcleos pode ser alterado sem interferir no processo de crescimento. Quando há uma sobreposição das duas etapas, os processos não podem ser manipulados separadamente e consequentemente o controle de tamanho, forma, dispersão de tamanhos, morfologia e estabilidade da fase coloidal será baixo.⁶⁶

Figura 12: Representação da separação entre as etapas de nucleação e crescimento

Mecanismo Clássico de Nucleação e Crescimento

O mecanismo clássico de formação de cristais foi proposto por LaMer⁶⁷ e consiste em uma etapa de nucleação homogênea seguida por uma etapa de crescimento controlada por difusão.

No processo de nucleação vários núcleos são gerados ao mesmo tempo, de forma instantânea, e iniciam seu crescimento sem que ocorra uma nucleação adicional. Dessa forma não há variação no número de partículas durante a etapa de crescimento e todas elas estão sujeitas

às mesmas condições de crescimento. Esse conceito, conhecido como nucleação explosiva ou *burst nucleation*, permite controlar o tamanho das partículas através da separação das etapas de crescimento e nucleação e tem sido adotado como conceito central para síntese de nanopartículas monodispersas.⁶⁸⁻⁷⁰ Para produzir cristais mais uniformes é necessário induzir um único evento de nucleação e prevenir etapas de nucleação subsequentes após o início do crescimento.

LaMer utilizou um processo de nucleação homogênea para descrever essa nucleação explosiva. Nesse processo a energia de ativação para que o sistema passe de uma fase homogênea em solução para uma fase heterogênea é alta, e essa energia é fornecida pela condição de supersaturação do meio. Um gráfico de variação da concentração do monômero em função do tempo (gráfico de LaMer), Figura 13, mostra que a concentração de monômero aumenta com o tempo, dependendo da cinética da reação de geração do mesmo. Porém a nucleação só inicia na etapa II, mesmo que a condição de supersaturação seja atingida. Isso ocorre devido à alta energia de ativação para o processo de nucleação.

Figura 13: Gráfico de LaMer: variação da condição de supersaturação em função do tempo, onde S é a supersaturação e S_c a supersaturação crítica.⁷⁰

A partir do início da nucleação os monômeros são consumidos e a condição de supersaturação diminui até que a taxa de nucleação seja zero, etapa III da Figura 13. A partir disso

o sistema entra na etapa de crescimento, na qual não é observada nucleação e as partículas crescem enquanto a solução estiver supersaturada.

A variação de energia livre de Gibbs para a etapa de nucleação, Equação 2, depende da energia livre superficial por unidade de área (γ) e da variação de energia livre entre os monômeros em solução e no cristal (ΔG_v). Essa última é dada pela Equação 3, onde S é a supersaturação do meio, V_m é o volume molar, r é o raio do núcleo formado, T a temperatura e R a constante dos gases ideais.

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v$$

Equação 2

$$\Delta G_v = (-RT \ln S) / V_m$$

Equação 3

A energia livre superficial sempre será positiva e a energia livre da transformação (ΔG_v) sempre será negativa enquanto a solução estiver em condição de supersaturação. Plotando uma curva de variação de energia livre em função do raio do núcleo, Figura 14, observa-se uma região de máximo na qual define-se o raio crítico que o núcleo deve atingir pra que ele seja estável em solução. Dessa forma o comportamento do núcleo em solução supersaturada depende do seu tamanho. Sendo assim o núcleo será dissolvido se seu tamanho for menor que o raio crítico ou irá crescer se seu raio for maior que o raio crítico. Derivando e igualando a zero a Equação 2 obtém-se o raio crítico dado pela Equação 4, e a energia livre crítica dada pela Equação 5, pra a etapa de nucleação.

$$r_c = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v} = \frac{2\gamma V_m}{RT \ln S}$$

Equação 4

$$\Delta G_c = \frac{16\pi\gamma^3}{3(\Delta G_v)^2} = \frac{16\pi\gamma^3 V_m^2}{3(RT \ln S)^2}$$

Equação 5

Figura 14: Variação de energia livre em função do raio do núcleo.⁶⁹

A taxa de variação do número de partículas N em função do tempo pode ser calculada na forma de equação de Arrhenius, Equação 6, definindo a taxa de nucleação. Onde γ é a energia livre superficial, V_m o volume molar, k a constante de Boltzman, T a temperatura, N_A o número de Avogadro e S a supersaturação.

$$\frac{dN}{dt} = A \exp\left[-\frac{\Delta G_c}{kT}\right] = A \exp\left[\frac{16\pi\gamma^3 V_m^2}{3k^3 T^3 N_A^2 (\ln S)^2}\right]$$

Equação 6

Analisando a Equação 4 a Equação 6 tem-se que as variáveis experimentais que podem ser controladas são a temperatura, a supersaturação e a energia livre superficial. Conforme a supersaturação inicial aumenta, a concentração máxima de núcleos aumenta e o tempo para atingi-la diminui. Para valores elevados de supersaturação, ao final do processo de nucleação a supersaturação cai para níveis nos quais não há crescimento dos núcleos. Como um alto valor de supersaturação faz com que o raio crítico diminua, os clusters gerados tendem a dissolver e os monômeros formados são incorporados às partículas maiores. Dessa forma a concentração de partículas cai em tempos longos, Figura 15A.

Para valores de supersaturação menores a concentração de partículas é menor e o tempo para atingir o valor máximo é maior, porém os clusters crescem a uma taxa constante mantendo a supersaturação a um nível baixo e constante evitando uma segunda etapa de nucleação. O aumento de temperatura e a diminuição da energia livre superficial têm a mesma influência do aumento da supersaturação, Figura 15B e C.⁷⁰

Figura 15: Variação do número de partículas em função do tempo para diferentes valores de (a) supersaturação, (b) temperatura e (c) energia livre superficial. Adaptado da referência ⁷⁰

Esse modelo termodinâmico para a etapa de nucleação apresenta algumas falhas quando trata-se de nanocristais. Geralmente é assumido que os valores de energia livre superficial e ΔG_v

são constantes, porém esses valores apresentam uma forte dependência com o tamanho e forma das nanopartículas.^{71,72} Com o decréscimo do tamanho dos cristais a proporção de átomos na superfície cresce drasticamente, com isso há uma forte força motriz para que nanocristais diminuam sua energia livre superficial através de processos de reconstrução de superfície ou modificando a estrutura do cristal.⁶⁶

Uma etapa de crescimento sem nucleação adicional é essencial para uma distribuição estreita de tamanhos. O tratamento teórico mais simples do processo de crescimento de cristais leva em consideração apenas a difusão dos monômeros e o fluxo dos mesmos (J) para suprir a partícula. A taxa de crescimento (dr/dt) será dada pela Equação 7

$$J = \frac{4\pi r^2}{V_m} \frac{dr}{dt}$$

Equação 7

Quando a distância entre a superfície das partículas é grande o suficiente, a camada de difusão formada na periferia de cada partícula não é perturbada pelas partículas vizinhas. Consequentemente, o crescimento de cada partícula pode ser tratado individualmente. Considerando partículas esféricas em uma solução homogênea, existe um gradiente de concentração na sua superfície, Figura 16. A difusão dos monômeros nesse gradiente será dada pela lei de Fick de difusão e a taxa de crescimento da partícula será dada pela Equação 8:

Figura 16: Gradiente de concentração de monômeros na periferia dos cristais.⁶⁹

$$\frac{dr}{dt} = \frac{V_m D}{r} (C_{\text{bulk}} - C_s)$$

Equação 8

Onde C_{bulk} é a concentração de monômeros no seio da solução, C_s a concentração de monômeros na superfície do cristal, D o coeficiente de difusão, V_m o volume molar e r o raio do cristal. Se C_{bulk} e C_s forem constantes para todas as partículas, a taxa de crescimento é inversamente proporcional ao raio. Como o fluxo de monômeros é proporcional a r^2 e a taxa de crescimento é inversamente proporcional ao volume molar (r^3), a taxa de crescimento do cristal diminui com o aumento do raio. Dessa forma, para uma população de partículas a variação da distribuição de raios pode ser calculada pela Equação 9, onde $\bar{r}$ é a média dos raios.

Quando C_{bulk} é maior que C_s o lado direito da Equação 8 é sempre negativo. Portanto, a variância da distribuição de tamanhos de uma população de partículas sempre diminui independente da distribuição de tamanhos inicial, desde que todas partículas estejam submetidas as mesmas condições e não ocorra uma segunda etapa de nucleação. Esse processo de autorregulação do crescimento é conhecido como efeito de foco (*focusing effect*).^{66,73,74}

$$\frac{d(\sigma^2)}{dt} = 2 V_m D (C_{\text{bulk}} - C_s) \left[1 - \bar{r} \left(\frac{1}{r} \right) \right]$$

Equação 9

Contudo, esse modelo focado apenas na difusão das espécies é uma simplificação pois não considera a cinética das reações de crescimento dos cristais, de dissolução dos mesmos e de reações que geram os monômeros catalisadas pela superfície dos cristais. Levando tais reações em consideração o fluxo de monômeros pode ser expressado em função da constante de velocidade das reações na superfície dos cristais (k), Equação 10.

$$J = 4\pi r^2 k (C_s - C_r)$$

Equação 10

Quando a difusão dos monômeros é o fator limitante para o crescimento dos cristais a taxa de crescimento pode ser simplificada expressada pela Equação 8. Porém se a velocidade das reações superficiais é o fator limitante para a variação de tamanho dos cristais a taxa de crescimento será dada pela Equação 11, onde C_r é a solubilidade da partícula.

$$\frac{dr}{dt} = kV_m(C_{bulk} - C_r)$$

Equação 11

Porém quando tanto a difusão das espécies quanto as cinéticas de reações superficiais controlam o crescimento das nanopartículas, a variação do raio em função do tempo é dada pela Equação 12, onde D é o coeficiente de difusão.

$$\frac{dr}{dt} = \frac{DV_m (C_{bulk} - C_r)}{r + D/k}$$

Equação 12

De acordo com a relação de Gibbs-Thomson, a solubilidade de um cristal esférico varia com o seu raio devido a um potencial químico extra. Com isso C_r será dado pela Equação 13, onde V_m é o volume molar da cristal, r seu raio, T a temperatura e k_b a constante de Boltzman.

$$C_r = C_{bulk} \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{rk_B T}\right)$$

Equação 13

Substituindo a Equação 13 na Equação 12 obtêm-se uma expressão geral para o crescimento de nanopartículas, Equação 14.

$$\frac{dr^*}{d\tau} = \frac{S - \exp\left(1/r_{cap}\right)}{r_{cap} + K}$$

$$r_{cap} = \frac{RT}{2\gamma V_m} r$$

$$\tau = \frac{k_B^2 T^2 D C_{bulk}}{4\gamma^2 V_m} t$$

$$K = \frac{k_B T D}{2\gamma V_m k}$$

Equação 14

Onde K o fator indica se o crescimento é controlado por difusão ou pela velocidade das reações superficiais. Se $D \ll 1$ a difusão é predominante sobre as reações superficiais.

Porém será que os modelos físico-químicos de nucleação e crescimento mostrados nessa seção são capazes de explicar o mecanismo de crescimento de nanopartículas de ouro? É possível controlar as diferentes etapas para proporcionar um melhor controle de tamanho e forma das partículas sintetizadas pelo método de Turkevich? Na próxima seção serão discutidos as semelhanças e diferenças entre os modelos apresentados nessa seção e os processos observados experimentalmente para a síntese de nanopartículas de ouro em meio aquoso.

4.1.2 Síntese de Nanopartículas de Ouro

Dentre os métodos reportados na literatura para síntese de AuNP, como os desenvolvidos por Brust et al.⁷⁵ em meio orgânico, e aqueles envolvendo sistemas anisotrópicos,^{12,76-81} o método de Turkevich et al.^{8,82} com algumas modificações introduzidas por Frens⁸³, continua sendo o método mais utilizado para a preparação de nanopartículas esféricas de ouro em solução aquosa. Turkevich et al.^{8,82} foi o primeiro a demonstrar a possibilidade de variar o tamanho da partícula

através do controle da concentração de agente redutor e da temperatura da reação. A síntese se baseia na redução do ácido tetracloáurico com citrato de sódio e, apesar da simplicidade experimental, o mecanismo de formação das partículas ainda não foi completamente elucidado.

Desde então, esse método tem sido extensivamente empregado uma vez que envolve reagentes e procedimentos simples. Contudo produtos preparados por diferentes laboratórios podem exibir diferentes propriedades espectrais e cinéticas, por exemplo. Muitos autores têm se preocupado com esse problema⁸⁴⁻¹⁰⁷, com inúmeras questões sendo respondidas com o passar do tempo, mas ainda necessitando de novas investigações do mecanismo envolvido.

Na literatura é estabelecido que o citrato apresenta três papéis diferentes: agente redutor⁸², agente estabilizante⁸⁴ e controlador do pH.⁹³ Dessa forma é possível controlar o tamanho e a forma das AuNP variando a proporção citrato/ sal de ouro, temperatura e agitação. Por exemplo, S. Biggs et al.⁸⁴ investigaram como as espécies aniônicas podem influenciar nos potenciais de superfície durante a formação das AuNP por microscopia de força atômica. Eles mostraram que as forças entre as superfícies de ouro se tornam atrativas quando há uma alta concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ na solução e um estado transiente de agregação das partículas é observado.

Pei et al.⁸⁹ sintetizaram e estabilizaram nanofios apenas variando a proporção citrato:Au e realizando a reação a uma temperatura de 80°C, sendo que a proporção ótima, entre as concentrações de reagentes, para formação de fios é de 0.2. Adicionalmente os autores mostram por HRTEM que os fios são formados por partículas menores com diferentes estruturas cristalinas que coalesceram de maneira aleatória. Nessa mesma linha, Pong e colaboradores⁹⁵ mostram a formação dos mesmos fios como um intermediário para geração de AuNP esféricas pelo método de Turkevich, sendo eles responsáveis para coloração preta-azulada observada no início do processo.

Xiaohui et al.⁹³ racionalizou o efeito do pH no processos de formação das AuNP, introduzindo o terceiro papel do citrato e mostrando que nanofios também são gerados mantendo a proporção citrato:Au constante e ajustando o pH do meio pela adição de HCl e NaOH. Dessa forma os autores propuseram um modelo para o mecanismo de formação das AuNP, baseado na formação ou não dos fios em função do pH, Figura 17.

Figura 17: Mecanismo proposto por Li et al. para formação das AuNPs pelo método de Turkevich. Retirado da referência⁹³

Apesar de numerosos trabalhos com intuito de elucidar o mecanismo de formação das AuNP existem poucos trabalhos apresentando estudos cinéticos em tempo real levando em consideração as cinéticas das reações de redução de ouro, de nucleação, agregação e crescimento.

Kumar e colaboradores⁹⁴ realizaram uma modelagem cinética dos processos que ocorrem no sistema levando em consideração as reações de redução, desproporcionamento, nucleação e crescimento. Na etapa de redução, a espécie $[\text{AuCl}_4]^-$ é reduzida gerando $[\text{AuCl}_2]^-$ e há a oxidação do citrato gerando acetoadicarboxilato (ACDC), Figura 18. Na etapa de desproporcionamento ocorre a redução do $[\text{AuCl}_2]^-$ a Au^0 catalisada pela formação de um complexo entre o $[\text{AuCl}_2]^-$ e a ACDC gerando os primeiros núcleos, mostrando que a concentração de ACDC influencia diretamente na etapa de nucleação.

Nas condições de síntese, a ACDC sofre decomposição térmica gerando acetona, que por sua vez pode atuar reduzindo o complexo $[\text{AuCl}_4]^-$, contribuindo para o aumento da concentração

de Au^0 durante a etapa de crescimento dos núcleos. A partir desse modelo o autor mostra a possibilidade de calcular as constantes de velocidade de cada etapa e analisar a influência das concentrações de reagentes e temperaturas na morfologia final das partículas. Apesar das previsões coerentes feitas com o modelo, toda análise experimental é feita com base nas características finais das partículas, mostrando a carência de estudos cinéticos em tempo real para o sistema.

Figura 18: Esquema de reações envolvidas no processo de formação de AuNP pelo método de Turkevich

Recentemente, o tratamento teórico de Ojea-Jimenez et al.¹⁰⁷ mostrou que o pH é um fator importante influenciando os caminhos dessas reações. Baseados em estudos cinéticos dos processos redox do íon $[\text{AuCl}_4]^-$ reportaram um mecanismo onde o citrato substitui um cloreto da esfera de coordenação do ouro em uma etapa rápida. Após sucessivos rearranjos, a ACDC é formada como produto principal da oxidação do citrato.¹⁰⁸

Um dos poucos trabalhos que mostram um estudo cinético experimental mais detalhado foi feito por Polte et al.¹⁰⁰ Nele os autores realizam a síntese em uma capilar de quartzo e

acompanham a evolução temporal do sistema por SAXS e XANES. Utilizando temperaturas de cerca de 75 °C e uma proporção citrato:Au de 10:1 demonstram que a etapa de redução é lenta e o estado de oxidação do ouro varia de 3 a 0, porém apresenta um máximo de cerca de 3.2 no início da reação devido a formação de complexos do tipo $[\text{AuCl}_x(\text{OH})_{4-x}]^-$, Figura 19A.

Por SAXS comprovaram que há uma etapa rápida de nucleação gerando partículas de aproximadamente 2nm. Em seguida há um crescimento lento dos núcleos (20 a 50 minutos), a partir de 50 minutos de reação há um rápido crescimento dos núcleos e consequentemente da banda de ressonância plasmônica, Figura 19B. Entre 20 e 50 minutos de reação há uma diminuição do número de partículas, indicando que os núcleos gerados são dissolvidos e as partículas crescem pelo mecanismo de Ostwald *ripening*, devido à baixa constante de velocidade da reação de redução do ouro.

Adicionalmente, mostram que a etapa final de crescimento apresenta um efeito de diminuição da polidispersidade, indicando um crescimento controlado pela difusão dos monômeros em solução, Figura 19C. Porém é importante frisar que o estudo foi realizado fora das condições de volume de reação, temperatura, velocidade de agitação e concentração de reagentes comumente utilizadas devido à adaptação ao instrumento.

Figura 19: Cinética dos processos envolvidos na formação de AuNP pelo método de Turkevich acompanhados por SAXS e XANES

Estudos sistemáticos em relação à morfologia, cinética e reprodutibilidade vêm sendo feitos, incluindo a adição correta de reagentes,^{101,105} uso de vidrarias específicas,¹⁰⁶ utilização de tampão ácido cítrico/citrato.¹⁰⁹ Porém as conclusões levam a crer que o mecanismo de nucleação e crescimento proposto por LaMer não se aplica a síntese de AuNP pelo método de Turkevich e apesar de inúmeros estudos não há um consenso a respeito dos mecanismos de formação das partículas de ouro.

Portanto, nesse capítulo vamos discutir o mecanismo de formação das AuNP sintetizadas pelo método de Turkevich em diferentes condições de concentração de reagentes, ou seja, diferentes valores de supersaturação, temperatura, velocidade de adição dos reagentes e velocidade de agitação. A discussão será feita com base na morfologia das partículas e em estudos

cinéticos em tempo real, procurando um melhor entendimento de todas as etapas da síntese, melhor controle das propriedades das partículas e maior reprodutibilidade.

4.2 Parte Experimental

Toda vidraria utilizada foi lavada com água régia ($3\text{HCl}:1\text{HNO}_3$), de forma a garantir que não houvesse qualquer substância que pudesse interferir na redução do ouro, ou na nucleação das partículas. Preparou-se 10,0 mL de uma solução 1% de citrato de sódio – $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Preparada essa solução, pesou-se 10,0 mg de HAuCl_4 em um frasco de 25,0 mL e transferiu-se para um balão de fundo redondo de três bocas de 125 mL seco. Então, foram adicionados 50,0 mL de água ultrapura, submetendo a solução a diferentes velocidades de agitação utilizando um agitador mecânico e uma haste de vidro. Utilizando um microcontrolador de temperatura baseado em Arduino com precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$ (a construção do microcontrolador é descrita no Apêndice 10.1) a solução de ácido tetracloroaurico foi submetida a aquecimento sob refluxo a diferentes temperaturas por 30 minutos. Com o auxílio de uma bomba peristáltica adicionou-se diferentes volumes da solução de citrato, mantendo a concentração de ouro sempre fixa. Rapidamente a solução ficou incolor, depois azul escura, roxa e finalmente vermelha. O aquecimento e a agitação foram mantidos por cerca de 5 minutos após a adição da solução de citrato e deixou-se o sistema resfriar à temperatura ambiente.

Um estudo estatístico do efeito da concentração de citrato, temperatura, velocidade de agitação e de adição de citrato foi realizado através de um planejamento fatorial 2^4 dos experimentos. As variáveis experimentais variadas foram a temperatura, velocidade de agitação, concentração de citrato de sódio e velocidade de adição da solução de citrato. O volume de reação e concentração de ouro foram mantidos constantes. O efeito do pH foi desconsiderado e sua variação será correlacionada com a concentração de citrato utilizada. A concentração de citrato

foi escolhida, em um primeiro momento, para variar de uma proporção de citrato:Au de 1:1 a 2.5:1, limites utilizados por Turkevich⁸² e Frens⁸³ em seus trabalhos.

O efeito da velocidade de agitação foi incluído visando um aumento de escala da síntese em etapas futuras. A velocidade de agitação deve influenciar diretamente na difusão das espécies em solução, alterando a taxa de crescimento, contudo seus valores foram escolhidos empiricamente com base na estabilidade das partículas sintetizadas. As condições experimentais são variadas entre seus níveis máximo (indicado com um sinal positivo) e mínimo (indicado com sinal negativo). A Tabela 1 sumariza as condições experimentais utilizadas para cada ensaio do planejamento. Adicionalmente são feitos ensaios em triplicata no ponto médio de cada fator com intuito de verificar a validade do planejamento.

Tabela 1: Dados do planejamento fatorial 2⁴

	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	V citrato (mL)	adição (μLs^{-1})
-	85	900	0.65	100
+	95	1700	1.7	1000
Ponto Médio	90	1300	1.1	500

Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	V citrato (mL)	adição (μLs^{-1})
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+
17	P. Médio	P. Médio	P. Médio	P. Médio

18	P. Médio	P. Médio	P. Médio	P. Médio
19	P. Médio	P. Médio	P. Médio	P. Médio

Além dos ensaios envolvidos no planejamento fatorial, com o objetivo de discutir o mecanismo de formação das AuNP foram realizadas sínteses utilizando soluções de citrato 3% e 7%, adicionando um volume de 1.7 ml e mantendo a concentração de ouro fixa, atingindo proporções de citrato:Au de 7:1 e 14:1, respectivamente. Adicionalmente, foram realizadas sínteses mantendo a proporção de citrato:Au em 2.5:1 e utilizando um volume de 120 ml.

Com o intuito de obter partículas de mesmo tamanho partindo de condições de sínteses diferentes foram feitas modificações nas sínteses, porém, mantendo a mesma concentração de ouro. Essas modificações são apresentadas na Tabela 2. As partículas sintetizadas nessas variações serão denominadas cit-AuNP e ceto-AuNP, em função do tipo de molécula que é encontrada na sua superfície, conforme será discutido no Capítulo 6.

Tabela 2: Modificações das condições experimentais utilizadas no planejamento fatorial dos experimentos

	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	V Citrato (mL)	adição (μLs^{-1})
cit-AuNP	900	100	1.7	47.3
ceto-AuNP	1150	95	1.0	1000

A caracterização das partículas foi feita por MEV, AFM, espectroscopia eletrônica e espalhamento dinâmico de luz, seguindo as especificações descritas no Capítulo 3. A análise da cinética da formação das AuNP foi realizada em tempo real através da análise de imagens, capturadas por uma câmera convencional, utilizando o programa MasterView, conforme discutido na Seção 3.1.7. Uma foto do sistema utilizado é mostrada na Figura 20.

Figura 20: Sistema de reação utilizado para síntese de AuNP e análise em tempo real da cinética de formação

4.3 Resultados e Discussões

4.3.1 Síntese de AuNP: Caracterização Morfológica

Como apresentado no capítulo 4.1.2, o mecanismo geral de crescimento de cristais é baseado em uma nucleação instantânea com crescimento controlado pela difusão dos monômeros e pelas reações na superfície das partículas. Para produzir AuNP monodispersas seria necessário, portanto, separar temporalmente ou fisicamente a etapa de nucleação e crescimento. Porém as mudanças observadas no decorrer da síntese de AuNP, dependendo das condições experimentais, não seguem o mecanismo clássico proposto por LaMer.

Buscando entender melhor o mecanismo de formação das AuNPs, analisou-se a influência de parâmetros experimentais cruciais para a síntese através de um planejamento fatorial dos experimentos. Esse tipo de planejamento é utilizado para determinar a influência de uma ou mais variáveis experimentais passíveis de controle, chamada de fatores, sobre uma ou mais

propriedades do sistema, denominadas respostas. Nesse caso o sistema atua com uma função desconhecida sobre as variáveis experimentais e produz como saída as respostas observadas. O foco desse tipo de método não é descobrir a função exata sob a qual o sistema atua e sim a obtenção de um modelo empírico semi-quantitativo baseado nas observações experimentais.¹¹⁰ Uma discussão mais detalhada do método pode ser encontrada na referência ¹¹⁰.

Para o sistema em questão foram escolhidos quatro fatores: temperatura, velocidade de agitação, volume e velocidade de adição de citrato. Foram escolhidas como respostas do sistema o diâmetro médio das partículas (d) e seu desvio padrão (σ), e a razão de aspecto (r_a = diâmetro/comprimento). Os valores das respostas são apresentados na Tabela 3. O cálculo dos efeitos de cada fator sobre as respostas e o efeito da combinação da variação simultânea de dois ou mais fatores foram calculados pela equação matricial apresentada na Equação 15.¹¹⁰ Onde X^t é a matriz transposta dos coeficientes de contraste, que representa os limites máximos e mínimos de cada fator, apresentados na Tabela 1, e a interação entre os fatores; e y é a matriz coluna das respostas do sistema, apresentada na Tabela 3. Os valores dos efeitos de cada variável experimental estudada são apresentados na Tabela 4.

$$Efeito = \frac{1}{8} X^t y$$

Equação 15

Tabela 3: Valores de diâmetro médio (d) e seu desvio padrão(σ) e razão de aspecto (r_a) AuNP sintetizadas no planejamento fatorial

Ensaio	d (nm)	σ	r_a
1	59,78	22,83	1,25
2	102,10	28,52	1,34
3	58,27	26,92	1,18
4	49,07	16,12	1,29
5	36,52	7,90	1,30
6	38,37	6,27	1,26
7	22,43	4,27	1,19
8	22,18	4,63	1,18
9	61,51	32,28	1,26

10	73,44	24,66	1,345
11	57,20	29,72	1,28
12	51,64	17,87	1,32
13	35,92	8,21	1,41
14	26,89	5,24	1,24
15	33,35	6,81	1,32
16	28,49	4,22	1,15

Tabela 4: Valores dos efeitos de cada fator nas respostas do sistema

1	Temperatura
2	Velocidade de Agitação
3	Concentração de citrato
4	Velocidade de Adição

	Efeitos em d	Efeitos σ	Efeitos em r_a
1	3,40	-3,92	-0,0029
2	-13,98	-3,17	-0,0314
3	-33,60	-18,92	-0,0127
4	-2,52	1,44	0,0200
12	-8,36	-2,29	-6,9E-05
13	-6,47	2,21	-0,0452
14	-5,28	-2,33	-0,0222
23	6,17	1,24	-0,0158
24	7,21	0,23	0,0083
34	3,81	-1,09	0,0015
123	8,88	2,88	0,0033
124	5,03	1,33	-0,0054
134	1,40	1,25	-0,0134
234	0,11	0,48	-0,0071
1234	-3,46	-1,734	0,00161

Os valores da Tabela 4 podem ser interpretados como a variação da resposta do sistema quando o valor do fator experimental é alterado de seu valor mínimo para o seu valor máximo. Por exemplo, quando a temperatura varia de 85 °C para 95 °C há um aumento no tamanho médio das partículas de 3.4%, indicado pelo valor do efeito no diâmetro de 3.4. Já quando há uma variação na concentração de citrato há uma diminuição do tamanho médio das partículas de 33.6%, indicada pelo valor do efeito no diâmetro das partículas do fator 3 de -33.6.

Nesse tipo de planejamento não se conhece a função pela qual o sistema atua nas variáveis experimentais alterando as respostas observadas, portanto, é comum supor que essa função possa ser expandida e uma série Taylor.¹¹⁰ Na qual os fatores individuais são termos de primeira ordem na série e a combinação de fatores dois a dois, e assim por diante, são termos de maiores ordens. Dessa forma espera-se que o efeito da combinação de três ou mais fatores sejam pequenos podendo ser desconsiderados para análise da sua influência sobre as respostas. Esse procedimento é equivalente a truncar a série no termo de segunda ordem.

Contudo, os valores dos termos de terceira e quarta ordem podem ser atribuídos às flutuações aleatórias do sistema, representando o ruído de cada efeito. Dessa forma a variância, consequentemente o desvio padrão, dos efeitos podem ser calculados através da combinação de três ou mais efeitos. Os valores do desvio padrão calculado foram de 4% para o efeito no diâmetro, 1.5% para os efeitos na distribuição de tamanhos e 0.1% para a razão de aspecto. Portanto os efeitos só serão significativos se o seu valor for maior do que o valor do seu respectivo erro.

Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que os fatores mais significativos para as respostas do sistema são a concentração de citrato, a temperatura e a variação simultânea de temperatura e velocidade de agitação. Observa-se uma diminuição de cerca de 33% no diâmetro médio das partículas e de 18% na distribuição de tamanhos quando a proporção citrato:Água varia de 1:1 para 2.5:1. Ou seja, um aumento na concentração de citrato torna as partículas menores e mais monodispersas. Comparando os ensaios 12 e 16 (Tabela 1 e Tabela 3), nos quais a concentração de citrato aumenta do 12 para o 16 e todos outros fatores são mantidos no seu valor máximo, há uma diminuição no tamanho da partícula e em seu desvio padrão de 45 e 75 %, respectivamente.

Essa conclusão pode ser melhor visualizada através dos gráficos de distribuição de tamanhos Figura 21 e Figura 22. Os ensaios com maior concentração de citrato, ensaios 5 a 8 (Figura 21) e 13 a 16 (Figura 22), apresentam um menor tamanho de partículas em relação aos

ensaios realizados com menor concentração de citrato, ensaios 1 a 4 (Figura 21) e 9 a 12 (Figura 22). Isso sugere que a nucleação nesse sistema é do tipo explosiva e tende a apresentar apenas uma etapa. Em concentrações mais altas de citrato a condição de supersaturação é maior e atingida mais rapidamente, portanto são gerados um número maior de núcleos, levando a uma diminuição significativa do tamanho das partículas.^{69,111} Adicionalmente a menor distribuição de tamanhos nos ensaios realizados com maior concentração de citrato sugere uma separação maior entre a etapa de nucleação e crescimento. Para comprovar essa suposição um estudo cinético mais detalhado será discutido na próxima no próximo capítulo.

Figura 21: Distribuição de tamanhos para os ensaios 1 a 8, calculada a partir da contagem de 1000 partículas nas imagens de MEV.

Figura 22: Distribuição de tamanhos para os ensaios 13 a 16, calculada a partir da contagem de 1000 partículas nas imagens de MEV.

A velocidade de agitação apresenta uma influência significativa sobre as respostas do sistema, em média há uma diminuição de 14% no diâmetro e de 4% na distribuição de tamanhos quando a velocidade de agitação aumenta de 900 para 1700 rpm.

Analisando cuidadosamente a Tabela 3 observa-se que o efeito da agitação é mais pronunciado em temperaturas maiores e menor concentração de citrato. Por exemplo, comparando os ensaios 10 e 12, feitos nessas condições, houve uma diminuição de aproximadamente 30% no tamanho médio e polidispersidade das partículas. Já nos ensaios 9 e 11, feitos em menores temperaturas e concentração de citrato, têm-se uma diminuição de apenas 6% e 9% no diâmetro e seu desvio padrão, respectivamente. Esse efeito da combinação dos fatores pode ser visto na Tabela 4 através do valor na linha 12 e 13, e da combinação dos três fatores na linha 123. Apesar de pequenos, os valores desses efeitos estão dentro do intervalo de confiança, por tanto podem ser considerados efeitos reais.

A menor influência da velocidade de agitação em temperaturas e concentrações de citrato menores pode ser interpretada em função das velocidades das reações de redução do $[\text{AuCl}_4]^-$ tanto antes da nucleação quanto durante a etapa de crescimento, Figura 18 e Equação 11.

Em temperaturas mais baixas a velocidade de crescimento será determinada principalmente pela velocidade das reações na superfície das partículas. Dessa forma o crescimento é controlado pela taxa de redução do ouro catalisada pelos clusters e pela velocidade de incorporação dos átomos de Au^0 ao retículo cristalino. A difusão das espécies não será determinante pois a velocidade de difusão será maior que a velocidade das reações, diminuindo o efeito da velocidade de agitação nas respostas do sistema em temperaturas mais baixas.

Contudo, em temperaturas altas as reações superficiais ocorrem em uma velocidade maior e a taxa dessas reações será controlada pela concentração superficial das espécies, ou seja, pela difusão das espécies através da dupla camada elétrica de cada partícula. Aumentando o efeito da velocidade de agitação no tamanho final das partículas.

O efeito da temperatura não é simples de ser analisado. Há uma série de reações dependentes da temperatura que apresentam efeitos interconectados atuando em diferentes etapas da formação das partículas. A taxa de redução do $[\text{AuCl}_4]^-$ pelo citrato será determinante para a supersaturação do meio, que é atingida em concentrações de cerca de 10 nM de Au^0 , influenciando diretamente na etapa de nucleação. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade de redução e maior será a supersaturação do meio, consequentemente menor serão as partículas geradas.

Em contrapartida, temperaturas maiores também favorecem a decomposição da acetonadicarboxilato (ACDC) gerando acetona e CO_2 . Como é descrito na literatura, esta é responsável pela catálise da reação de desproporcionamento do $[\text{AuCl}_2]^-$ gerando Au^0 , através da formação de complexos com geometria adequada que o favorecem.⁹⁴ Portanto a ACDC atua diretamente na nucleação dos átomos de Au^0 . Então, a elevação da temperatura leva a uma nucleação mais lenta e a uma condição menor de supersaturação, aumentando o tamanho final das partículas.

Por fim, uma maior concentração de acetona, gerada pela decomposição da ACDC, leva a geração de Au^0 em tempos mais longos, podendo favorecer uma segunda nucleação e uma mudança na taxa de crescimento, devido ao aumento da supersaturação, alterando o tamanho e distribuição de tamanhos das AuNP. Dessa forma, o efeito da temperatura não pode ser analisado apenas com base na morfologia final das partículas e será retomado na discussão da cinética de formação das partículas.

A velocidade de adição do citrato de sódio tem pouca influência na morfologia das partículas. Em média, há uma diminuição do tamanho de cerca de 3% e da distribuição de tamanhos de 1.5%, porém esses valores estão fora do intervalo de confiança. Analisando ensaios pontuais, observa-se que nos ensaios 2 e 10, 6 e 14 uma maior velocidade de adição leva a uma

diminuição de cerca de 30% no tamanho médio. Esses quatro ensaios têm em comum valores de temperatura e velocidade de agitação, sendo iguais a 95°C e 900 rpm, respectivamente.

Para que ocorra uma diminuição no tamanho das partículas a concentração de núcleos ao final da etapa de nucleação deve ser elevada, portanto nesses ensaios uma maior velocidade de adição deve favorecer a etapa de nucleação, através do aumento da taxa de redução do ouro pelo citrato. Em contrapartida, nos ensaios 8 e 16 houve uma diminuição do tamanho da partícula com a diminuição da velocidade de adição de citrato. Podemos supor que uma velocidade de adição menor mantém a concentração de ACDC em níveis favoráveis durante toda etapa de nucleação, favorecendo a formação dos clusters. Porém, a determinação da variação da concentração de ACDC em função do tempo é uma tarefa extremamente complicada.

A razão de aspecto (r_a) apresenta pouca variação e o efeito dos quatro fatores estudados não é significativo. Em geral as partículas apresentam uma razão de aspecto de 1.1 a 1.3, sendo quase esféricas. A razão de aspecto leva em consideração a relação entre diâmetro e comprimento e é importante para a caracterização de nano bastões.⁷⁹ Porém, quando se trata de partículas de diferentes formas, deve-se considerar as três dimensões para a caracterização das mesmas.^{112,113}

As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram a formação de partículas planares, Figura 23 e Figura 24, dependendo da condição experimental utilizada. As sínteses que apresentam maior rendimento para a formação de partículas planares são aquelas que utilizam menores concentrações de citrato, ensaios 1 a 4 e 9 a 13. Sendo o ensaio 2 e 10 com o maior rendimento. Tais partículas apresentam um diâmetro médio de 100 nm, uma razão de aspecto de 1.3 e uma espessura variando de 10 a 20 nm. Todos ensaios realizados com maior concentração de citrato apresentaram apenas partículas quase esféricas, como pode ser visto nas microscopias dos ensaios 5 a 8 e 13 a 16 apresentados nas Figura 23 e Figura 24.

Figura 23: Microscopias Eletrônica de Varredura dos ensaios 1 a 8

Figura 24: Microscopia Eletrônica de Varredura dos ensaios 9 a 16.

A forma das partículas está intimamente ligada ao mecanismo de formação e apenas analisando os efeitos dos fatores sobre a morfologia destas não é possível chegar a uma conclusão do porquê da tendência de formação de partículas planares em condições estequiométricas de citrato e Au(III), uma vez que o mecanismo de nucleação e crescimento de LaMer explica apenas a formação de partículas esféricas. Isso indica a necessidade de estudos cinéticos em tempo real para esse sistema.

Tendo em vista apenas a caracterização morfológica das partículas, de maneira geral um aumento na concentração de citrato leva à formação de partículas menores e mais monodispersas, sugerindo uma etapa de nucleação mais rápida devido à maior supersaturação do meio, segundo o mecanismo de LaMer. A temperatura apresenta um efeito mais complexo devido a regulação de diferentes reações atuantes em cada etapa da formação das partículas. Seu efeito é mais pronunciado quando combinado com a variação da velocidade de agitação, por exemplo, devido ao balanço das velocidades das reações na superfície e da difusão/convecção das espécies. Já a velocidade de adição de citrato aparentemente tem um efeito no controle da concentração de ACDC com o tempo favorecendo a nucleação das partículas.

4.3.2 Estudos Cinéticos do Mecanismo de Formação de AuNP

Para uma análise mais profunda do mecanismo de crescimento das nanopartículas é fundamental a obtenção de dados cinéticos dos processos envolvidos em cada etapa da síntese. Como foi discutido no Capítulo 4.1.2 existem poucos estudos cinéticos em tempo real. O método mais utilizado é a espectroscopia no UV-Visível, porém sua maior desvantagem é o fato de que a reação deve ser interrompida, através da diminuição brusca da temperatura ou adição de NaCl e HCl, comprometendo a resolução temporal do método.

Devido às propriedades plasmônicas das AuNPs, que serão abordadas em maior detalhe no Capítulo 5, o processo de formação das mesmas é acompanhado por intensas mudanças de coloração. Inicialmente a solução de $[\text{AuCl}_4]^-$ apresenta uma coloração amarelada, devido às transições de transferência de carga do complexo de ouro na região de 300 a 400 nm. Com a adição do citrato sobre a solução de sal de ouro em ebulição, o sistema reacional passa a ser incolor, preto-azulado, roxo e finalmente vermelho, quando as partículas esféricas são formadas.

Uma alternativa para o estudo em tempo real dos processos envolvidos na formação das AuNP é a análise de imagens, na qual é feita uma decomposição do espectro RGB de uma região selecionada das imagens capturadas por uma câmera digital,^{59,60} conforme descrito nos Capítulos 2.1 e 3.1.7. Nesse caso as partículas atuam como um filtro seletor absorvendo determinados comprimentos de onda e a cor captada pela câmera será proveniente da luz espalhada subtraindo os comprimentos de onda absorvidos. Nesse caso uma solução transparente, que não apresenta absorção, possuirá valores de RGB altos e próximos. Já uma solução preta, que absorve em uma faixa ampla do espectro visível, apresenta valores baixos de RGB.

Cada mudança de coloração é indicativa de um determinado processo. Por exemplo, a redução de Au(III) a Au^0 , é indicada pela perda da coloração amarelada devido ao consumo do complexo de ouro. O processo de aglomeração e formação de fios é caracterizado pela coloração preta-azulada,⁹⁵ e o crescimento das partículas esféricas é indicado pelo aparecimento da coloração vermelha. Portanto, a intensidade e a taxa de variação da coloração, acompanhada pela variação no espectro RGB, podem trazer informações cinéticas do mecanismo de formação de AuNPs. A principal vantagem da análise de imagens em tempo real é o acompanhamento da reação nas condições exatas de síntese (sem interrupções), facilitando a análise da influência de cada fator experimental no mecanismo de formação das AuNPs.

4.3.2.1 Validação do Método

Para validar o método, primeiramente realizou-se uma síntese com uma concentração menor de reagentes e um volume maior para que fosse possível acompanhar a cinética da reação utilizando um espectrofotômetro de fibra óptica, juntamente com as análises de imagem, conforme descrito na parte experimental. Como o volume de reação e concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ não foram incluídos no planejamento fatorial dos experimentos é importante ter em mente que essa condição de síntese apresenta fatores extras influenciando as propriedades e o mecanismo de formação das partículas. Portanto esse experimento teve como objetivo apenas correlacionar as mudanças observadas no espectro de extinção com as mudanças no espectro RGB, validando o método de análise de imagens para o estudo da cinética de formação das AuNPs, através da comparação com uma técnica já estabelecida.

Na Figura 25, são apresentadas as curvas de variação de absorbância em 535, 540 e 785 nm e de intensidade do espectro RGB em função do tempo de reação. A adição de citrato foi feita em aproximadamente 15 segundos. Em cerca de 2 segundos a solução de $[\text{AuCl}_4]^-$, que inicialmente é amarela, torna-se incolor, indicando a redução dos íons de Au(III) a Au(I). O Au(I) formado sofre desproporcionamento gerando Au^0 , que será consumido na etapa de nucleação, e Au(III) que pode ser reduzido novamente, dependendo da quantidade de citrato presente na síntese. Essa etapa é marcada pelo crescimento dos três componentes do espectro RGB, região I da Figura 25. Entretanto, não é possível detectar essa etapa através da variação da absorbância devido às limitações da janela espectral do equipamento. O $[\text{AuCl}_4]^-$ apresenta bandas de transição de transferência de carga em 215 e 350 nm, fora da janela de 400-2500 nm do equipamento.

Com a condição de supersaturação atingida os átomos de Au^0 agregam formando os primeiros núcleos, que apresentam tamanho inferior a 2 nm^{100} e, portanto, não apresentam absorção no visível. Dessa forma, durante a etapa de nucleação a solução mantém-se incolor. Com

o crescimento dos núcleos até um tamanho de cerca de 5 nm, quando as partículas passam a apresentar absorção no visível,¹⁰⁰ inicia-se a segunda etapa de formação das partículas marcada por uma coloração preta-azulada intensa. Indicada pela queda brusca dos três componentes do espectro RGB e acompanhado por um aumento da absorbância em 530 e 785 nm, região II da Figura 25.

Figura 25: Variação de absorbância em 535, 540 e 785 nm (topo) e variação do espectro RGB (em baixo) em função do tempo. A região I representa a etapa de redução do sal de ouro dando início a etapa de nucleação. A região II representa a aglomeração dos núcleos formando fios. A região III indica o crescimento, em diâmetro dos fios. A região IV é marcada pelo processo de desagregação gerando partículas esféricas. Na região V a estabilização dos componentes do espectro RGB indica o término do crescimento.

Comparando as mudanças observadas na Figura 25 na região II com os espectros iniciais, mostrados na Figura 26, observa-se que o aumento da absorbância é devido ao surgimento de uma banda larga na região de 500 a 900 nm, indicando a aglomeração dos núcleos gerados na etapa de nucleação em uma rede bidimensional de fios de ouro, conforme mostrado na literatura.^{89,95} A absorção em comprimentos de onda maiores é devido a oscilação dos plasmons longitudinalmente nos fios e a absorbância em 530 nm é referente à oscilações plasmônicas no diâmetro dos fios.

Na terceira região da Figura 25 a absorbância em 785 nm mantém-se constante, indicando que a banda plasmônica conserva-se alargada, sugerindo que a estrutura bidimensional dos fios persiste durante essa etapa da reação. Juntamente há um aumento da absorbância em 530 nm, correspondente a um aumento de diâmetro dos fios. No espectro RGB essa etapa é marcada por uma menor taxa de variação dos três componentes. Esse processo leva a uma variação diferenciada dos três componentes no espectro RGB e acredita-se que dependendo da taxa de crescimento do diâmetro dos fios há uma maior contribuição do componente azul.

Figura 26: Variação do espectro de extinção ao decorrer da formação das AuNPs. As setas pretas indicam as mudanças iniciais, e as setas vermelhas indicam as mudanças em tempos mais longos.

Há ainda um quarto processo no qual ocorre a diminuição da absorbância em 785 nm e um aumento contínuo da absorbância em 530 nm, região IV da Figura 25. Acompanhando as mudanças no espectro de extinção, Figura 26, observa-se uma diminuição da largura de banda a meia altura, um deslocamento para o azul do máximo de absorção e um aumento de intensidade da banda plasmônica. Tais mudanças indicam a dissociação da estrutura bidimensional dando origem a partículas quase esféricas isoladas (queda de absorbância em 785 nm e afinamento da banda) e o crescimento das mesmas gerando partículas mais simétricas (deslocamento para o azul

e aumento da intensidade no máximo de absorção). No espectro RGB esses processos são traduzidos como um aumento do componente vermelho e a estabilização dos demais, região IV da Figura 25. Conforme as partículas crescem há o consumo dos monômeros diminuindo a condição de supersaturação até um certo nível que o crescimento cessa e não observa-se mais mudanças tanto no espectro de extinção quanto no espectro RGB, região V da Figura 25

A comparação entre a variação dos espectros de extinção e RGB em função do tempo, mostra a possibilidade de analisar a cinética dos processos de formação das AuNPs através de métodos de análise de imagens em tempo real. Essa metodologia proporcionou um estudo mais profundo sobre a influência dos parâmetros experimentais no mecanismo de formação de um sistema coloidal, que é o caso de uma suspensão de AuNPs. No próximo capítulo esse tipo de análise será aplicado nas sínteses realizadas dentro do planejamento fatorial, visando um controle de forma e tamanho mais preciso e reprodutível.

4.3.2.2 *Análise cinética das sínteses do planejamento fatorial*

Para a análise dos experimentos realizados dentro do planejamento fatorial as configurações da câmera foram alteradas para evitar a saturação de qualquer um dos três componentes do espectro RGB, como pode ser visto pelo valor inicial do componente azul na Figura 25. Com isso os valores iniciais de RGB são diferentes porém a escala temporal e o perfil das mudanças são compatíveis.

A discussão dos resultados das sínteses do planejamento fatorial foi dividida em dois blocos de acordo com a velocidade de adição de citrato, como pode ser visto na Tabela 1. Primeiramente serão discutidos os resultados para os ensaios realizados com menor concentração de citrato. Os resultados para as sínteses com maior taxa de adição serão discutidos em

comparação com os primeiros. Na Figura 27 são apresentadas as curvas de variação temporal do espectro RGB para os quatro primeiros ensaios do planejamento, realizados com proporção de citrato:Au igual a 1:1. Em todos os ensaios a adição de citrato foi feita no tempo zero.

Pelo mecanismo proposto por Ojea-Jimenez et al.^{107,108} a estequiometria global da reação de redução de Au(III) a Au⁰ seria de 3:2, (citrato:Au), Figura 18. Portanto nos ensaios realizados com proporção de 1:1 a redução de Au(III) não é completa apresentando uma menor velocidade e consequentemente um menor valor de supersaturação. Utilizando temperaturas menores, a condição de supersaturação será atingida mais lentamente e devido ao seu baixo valor, a concentração de núcleos será menor e o tamanho destes tende a ser maior.

Na região I da Figura 27, a etapa relacionada à redução dos íons de ouro e nucleação dos clusters, é mais longa para os ensaios realizados em menor temperatura. Os núcleos gerados apresentam tamanho inferior a 2 nm,¹⁰⁰ não apresentando absorção e espalhamento intensificados, não contribuindo para variações no espectro RGB. O único processo que causa variações de cor é a redução do sal de ouro, portanto, a inclinação da variação do componente azul representa a variação de cor por segundo e pode ser correlacionada a constante de velocidade global da reação de redução. Para o ensaio 1, Figura 27A, a duração dessa etapa é de cerca de 66 segundos e apresenta uma inclinação para a variação do componente azul de aproximadamente 0.20. Já para o ensaio 2 esse tempo é de 53 segundos e a inclinação do componente azul é de 0.24, indicando um aumento na velocidade da reação de redução do ouro com o aumento da temperatura do ensaio 1 para o 2.

Figura 27: Curvas de variação do espectro RGB em função do tempo para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D).

A segunda etapa do mecanismo (região II) de formação das partículas está relacionada com a aglomeração dos núcleos formando redes de fios de ouro, sendo caracterizada por uma coloração preta-azulada e uma queda brusca dos componentes do espectro RGB. Acredita-se que a aglomeração em fios ocorre devido à adsorção de $[\text{AuCl}_4]^-$ nos cristais ao final da etapa de nucleação. Como a concentração de citrato não é suficiente para reduzir 100% dos íons de Au(III) a concentração do complexo de ouro ao final da etapa de nucleação é alta o suficiente para que sua adsorção na superfície dos clusters seja favorecida em relação à adsorção de citrato ou da ACDC.

Dessa forma as forças entre as superfícies das partículas atingem um regime atrativo,⁸⁴ fazendo com que as partículas agreguem rapidamente, como pode ser visto pela alta inclinação das curvas RGB na região II da Figura 27 para todos ensaios. Porém não é possível notar uma diferença significativa entre as velocidades de aglomeração nos diferentes ensaios realizados com uma menor concentração de citrato. Nos ensaios 1 a 4, Figura 27 A a D, respectivamente, a inclinação da variação do componente vermelho na região II varia de -5.17 a -4.90. Essa pequena

variação na velocidade de aglomeração indica que a concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ ao final da nucleação é aproximadamente igual nesses quatro ensaios, consequentemente o valor da supersaturação também será próximo.

O ponto de inflexão do componente azul pode ser um indicativo do início da etapa de crescimento dos fios. Uma vez que estes apresentam uma banda de absorção larga na região do vermelho, a intensidade do componente azul sofre uma variação mais significativa com o crescimento do diâmetro dos fios. Para o ensaio 1, Figura 27A, por exemplo esse ponto ocorre em t igual a 82 segundos, enquanto que para o ensaio 2, Figura 27B, esse valor é de 73 segundos. Portanto, no ensaio 2 as partículas atingem a condição de crescimento em um tempo menor, levando a um maior tamanho de partícula, Tabela 3.

A região na qual há a estabilização da absorbância em comprimentos de onda acima de 785 nm, descrita nas Figura 25 e Figura 26, não é observada nos ensaios realizados em menor concentração de citrato, Figura 27 e Figura A 1 do Apêndice 10.2. Portanto, pode-se supor que nos ensaios com menor concentração de citrato o crescimento dos fios ocorre simultaneamente com sua dissociação, região IV das Figura 25 e Figura 27. Nos ensaios 2 e 4, são observadas duas regiões com velocidades de crescimento diferentes, região IV e V da Figura 27B e D. A região IV apresenta uma variação exponencial do componente vermelho, enquanto que a segunda etapa de crescimento, região V, apresenta uma variação quase linear.

Como discutido anteriormente, a baixa concentração de citrato em ambos os ensaios leva a uma concentração elevada de $[\text{AuCl}_4]^-$ durante a etapa de nucleação e crescimento. A alta temperatura dos ensaios 2 e 4 favorece a decomposição da ACDC em acetona, que por sua vez atua na redução do Au(III) em excesso, dando origem a uma segunda etapa de crescimento. A existência dessa etapa extra de crescimento explica o aumento de 41 % no tamanho médio das partículas no ensaio 2, mesmo apresentando uma nucleação mais rápida.

Os ensaios 9 a 12, feitos com menor concentração de citrato, apresentam característica morfológicas similares aos ensaios 1 a 4, Figura A 1 do Apêndice 10.2, maiores tamanhos de partículas, altas distribuições de tamanho e maior concentração de partículas planares (Tabela 3 e Figura 21 a Figura 24). Apresentando, também, cinéticas similares às observadas nos ensaios 1 a 4, lenta redução dos íons de Au(III) a Au(I), porém mais rápida que os ensaios 1 a 4, levando a uma cinética de nucleação lenta e como consequência partículas maiores. Tal diferença pode ser causada pela maior velocidade de adição de citrato nos ensaios 9 a 12. Contudo, ela não é suficiente para causar uma mudança grande na morfologia das partículas. Em seguida, há uma rápida aglomeração dos núcleos, comprovando que a alta concentração de Au(III) ao final da etapa de nucleação é a força motriz para a formação dos fios. Além disso, apresentam uma etapa de desaglomeração e crescimento ocorrendo simultaneamente, o que acredita-se ser, a causa da formação de partículas planares mais polidispersas.

Os ensaios realizados com maior concentração de citrato apresentam uma variação do componente azul na região de redução e nucleação, região I da Figura 28, mais acentuada, apresentando na média, um valor de inclinação próximo a 1. Isso indica que a redução ocorre mais rapidamente nesses ensaios e que o efeito do aumento da concentração de citrato, na velocidade de redução do ouro, é mais pronunciado em relação a um aumento de temperatura. A maior velocidade de redução e a concentração mais elevada de citrato, levam a uma condição de supersaturação mais elevada, favorecendo uma nucleação explosiva, aumentando a concentração de partículas e diminuindo seu tamanho, como pode ser observado na Tabela 3.

Figura 28: Curvas de variação do espectro RGB em função do tempo para os ensaios 5 (A), 6 (B), 7 (C) e 8 (D).

A maior taxa de redução do ouro aumenta o consumo de $[\text{AuCl}_4]^-$ diminuindo sua concentração ao final da etapa de nucleação. Os ensaios com maior concentração de citrato apresentam, velocidade de aglomeração menor e valor de inclinação dos componentes do espectro RGB na região II da Figura 28 variando de 4 a 2. Juntamente com os valores para os ensaios realizados com menor concentração de citrato, esses resultados mostram que este fator, além de regular a supersaturação do meio, regula a velocidade de aglomeração dos núcleos através da variação da concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ ao final do processo de nucleação.

Devido ao maior valor de supersaturação, ou seja, maior concentração de Au^0 , espera-se que o crescimento dos fios comece em tempos mais curtos em relação às sínteses com menor concentração de citrato. Uma possível evidência desse crescimento antecipado é a variação do perfil de queda do componente azul. Com a aglomeração e o crescimento dos clusters há um aumento da absorbância na região do verde e vermelho acarretando a maior contribuição do azul para a cor observada. Como pode ser visto na Figura 28, a queda do componente azul apresenta

um perfil diferente em comparação as sínteses realizadas com menor concentração de citrato, Figura 27, mostrando que possivelmente nesses casos o crescimento dos fios ocorre junto com a aglomeração.

Nos ensaios 5 a 8 foi observada uma etapa na qual o componente vermelho apresenta uma taxa menor de variação, que está relacionada a um processo de crescimento dos fios sem que os mesmos se dissociem, região III da Figura 28. Sendo que para os ensaios 7 e 8 (ensaios com partículas menores e mais monodispersas) essa etapa foi mais lenta, Figura 28C e D. Em seguida observa-se uma rápida etapa de desagregação e crescimento das partículas isoladas, região IV da Figura 28. Em todos os ensaios realizados com proporção de citrato:Au de 2.5:1 não foi observada uma segunda etapa de crescimento após a desagregação dos fios, indicando que nessas condições o principal responsável pela redução do sal de ouro é o citrato.

Os ensaios 13 a 16 apresentam características morfológicas e cinéticas similares aos ensaios 5 a 8. Partículas mais esféricas com tamanhos e distribuições de tamanhos menores. As variações no espectro RGB são semelhantes, Figura A 2 do Apêndice 10.2, apresentando um tempo de indução para o início da redução após a adição do citrato, uma rápida redução dos íons de Au(III) e uma nucleação mais explosiva. Também observa-se uma agregação rápida embora mais lenta, do que nos ensaios realizados com concentração mais baixa de citrato, além de uma separação entre a etapa de crescimento e desagregação, sendo a possível explicação para a formação de partículas mais esféricas. Porém, nos ensaios 13 a 16 há uma separação menor entre essas etapas em relação aos ensaios 7 e 8, por exemplo, podendo ser a causa da formação de partículas ligeiramente maiores e mais dispersas.

Acredita-se que a separação da etapa de aglomeração e crescimento da etapa de desagregação leve a um crescimento mais homogêneo dos fios. Juntamente com uma maior supersaturação inicial e a ausência de uma segunda etapa de crescimento, esse crescimento mais homogêneo dos fios e uma rápida desagregação são as razões da diminuição do tamanho de

partícula, do seu desvio padrão e da diminuição da razão de aspecto quando a concentração de citrato é aumentada. A separação da etapa de crescimento da etapa de desagregação é crucial para a geração de partículas mais esféricas. Enquanto que a ocorrência simultânea de tais etapas leva a uma maior formação de partículas planares.

O citrato de sódio apresenta três funções cruciais na síntese de AuNP pelo método de Turkevich: agente redutor, estabilizante e controlador do pH. Portanto, a variação de sua concentração influencia diretamente no mecanismo de nucleação e crescimento das partículas. Conforme discutido, um aumento da concentração de citrato leva a uma maior velocidade de redução de ouro e conseqüentemente, maior supersaturação, favorecendo uma nucleação explosiva, formando partículas menores com uma melhor dispersão de tamanhos.

A relação citrato:Au também tem um papel importante na estabilização dos núcleos gerados nas primeiras etapas da síntese. Para proporções próximas a 1:1, a concentração de citrato ao final da etapa de nucleação não é suficientemente elevada para estabilizar os núcleos, que agregam em uma etapa rápida, devido à adsorção de $[\text{AuCl}_4]^-$. Em proporções próximas a 3:1 há uma agregação mais lenta e o crescimento é iniciado logo após a aglomeração. Portanto, um aumento na concentração de citrato leva a uma maior estabilização dos núcleos, dificultando sua agregação ao final do processo de nucleação. Adicionalmente, para proporções estequiométricas há uma segunda etapa de crescimento devido à formação de Au^0 a partir da reação de Au(III) com a acetona formada pela decomposição da ACDC, aumentando o tamanho final das partículas.

A terceira função do citrato, de controle de pH, tem influência direta no mecanismo de formação das partículas devido a mudanças no potencial de redução do $[\text{AuCl}_4]^-$ e do próprio citrato.⁹³ Em pH elevado, maior concentração de citrato, há um aumento do potencial de redução do Au devido à formação de complexos do tipo $[\text{Au}(\text{OH})_x\text{Cl}_{4-x}]^-$. Com isso as reações de redução, e conseqüentemente o crescimento e a nucleação, tendem a ser mais lentos. O mesmo efeito pode

ser observado através do controle de pH pela adição de NaOH ou HCl, mantendo a concentração de citrato constante.⁹³

Para comprovar as tendências observadas em relação ao aumento de concentração de citrato no mecanismo de formação das AuNP realizou-se a síntese com proporções cit:Au igual a 7 e 14. Em ambas condições a etapa de redução foi mais rápida, como pode ser visto pela inclinação do componente azul no espectro RGB na região I da Figura 29. Sendo de 1.3 e 1.1 para sínteses com proporção cit:Au 7 e 14, respectivamente. A diminuição da velocidade de redução com o grande aumento da concentração de citrato evidencia o efeito do pH no potencial de redução do ouro.

O grande excesso de citrato e a alta taxa de redução elevam a supersaturação inicial, diminuindo o tamanho da partícula (10.5 ± 2.3 nm para proporção de 7:1 e 12.3 ± 2 nm para proporção de 14:1), Figura 29. O ligeiro aumento de tamanho se deve a uma taxa de redução e crescimento um pouco mais lenta quando a proporção cit:Au é de 14:1.

A estabilização dos núcleos devido à alta concentração de citrato e ao alto consumo de $[\text{AuCl}_4]^-$ faz com que não seja observada uma etapa de agregação ao término do processo de nucleação, como pode ser visto pela ausência da queda dos três componentes no espectro RGB na região II da Figura 29.

Figura 29: (A) Distribuição de tamanhos e (B) variação do espectro RGB para síntese utilizando proporção de citrato:Au de 7:1. (C) Distribuição de tamanhos e (D) variação do espectro RGB para síntese utilizando proporção de citrato:Au de 14:1.

O crescimento das partículas pode ser acompanhado pela queda do componente verde, indicando um aumento da absorção nessa região devido ao aumento da banda plasmônica. Adicionalmente o aumento do componente vermelho também é indicativo do crescimento das partículas, uma vez que o aumento da absorção na região de comprimentos de onda referente a cor verde leva a uma maior contribuição dos componentes vermelhos para a cor observada. Há uma queda brusca no valor do componente azul acompanhada de uma variação no componente vermelho e uma mudança de inclinação da variação do componente verde (região III da Figura 29). Estas podem ser atribuídas à variação da taxa de crescimento em tempos longos observada por Polte et al. através de análise de SAXS e XANES.¹⁰⁰

Analisando apenas o componente verde, pode-se aproximar a sua variação por duas retas com inclinações diferentes, indicando uma variação na taxa de crescimento das partículas, sendo que essa mudança de inclinação ocorre exatamente no ponto em que o componente azul também apresenta uma mudança na sua taxa de variação. Para o ensaio utilizando proporção de citrato:Au de 7:1 a taxa de variação, ou seja a inclinação da reta, do componente verde para a primeira etapa

é de 0.259, enquanto que para a síntese com proporção citrato:Au de 14:1 a taxa de variação para a mesma etapa é de 0.145. Isso é um indicativo de que quanto maior o excesso de citrato utilizado mais lento é o crescimento da partícula. Portanto, nessa condição, o efeito do pH sobressai em relação ao efeito de uma maior supersaturação.

A segunda etapa de crescimento apresenta uma velocidade semelhante para os dois casos, 0.54 para proporções de 7:1 e 0.57 para proporções de 14:1. Há duas possíveis causas para essa variação da taxa de crescimento, a primeira seria a redução do sal de ouro pela acetona formada em tempos longos de reação. Essa reação deve apresentar uma dependência menor com pH. Como a concentração de ouro é mantida constante a quantidade de ACDC gerada é praticamente igual nos dois casos, e consequentemente, a concentração de acetona é igual em ambos os casos. A segunda explicação seria que essa etapa é controlada pelas reações de desproporcionamento na superfície das partículas, e uma vez que em ambas as sínteses o tamanho das partículas é próximo, a velocidade das reações superficiais seria compatível.

Portanto, em condições de grande excesso de citrato o mecanismo de formação das AuNPs aproxima-se do mecanismo clássico de LaMer, apresentando uma etapa de nucleação instantânea, gerando um alto número de núcleos, que posteriormente crescem sem que ocorra grandes variações no número de partículas.

4.3.3 Caracterização da cit-AuNP e ceto-AuNP

Com o objetivo de facilitar o estudo das propriedades químicas e físico-químicas da superfície das AuNPs, discutidas nos Capítulos 0 e 0, foram planejadas duas sínteses que produzissem partículas de tamanhos próximos porém partindo de condições experimentais diferentes. As condições utilizadas são mostradas na Tabela 2.

Para a síntese da cit-AuNP, com a utilização de temperaturas maiores espera-se favorecer a reação de redução do ouro pelo citrato, favorecendo o processo de nucleação das partículas. Contudo, com a adição lenta de um volume maior de citrato pretende-se controlar a taxa de nucleação de maneira a controlar o número de núcleos formados, controlando o tamanho final das partículas. Com a combinação de uma alta temperatura (100 °C) e concentração de citrato espera-se que a ACDC formada seja decomposta em acetona, porém, a alta concentração de citrato deve impedir uma mudança na taxa de crescimento das partículas em tempos longos. Na temperatura utilizada, as velocidades das reações na superfície dos clusters devem ser favorecidas, portanto a difusão das espécies através da dupla camada será o fator limitante para o crescimento das partículas. Dessa forma, para controlar o crescimento utilizou-se uma velocidade de agitação menor que o convencional, de 900 rpm

Em contrapartida, a síntese da ceto-AuNP deve apresentar uma etapa de redução/nucleação mais rápida, causada pela rápida adição de citrato. Porém, devido à baixa concentração de citrato, o valor de supersaturação será baixo, diminuindo o número de clusters formados, aumentando o tamanho final da partícula. Pensando em evitar a decomposição da ACDC, porém, mantendo a temperatura alta o suficiente para que a reação de redução do ouro apresente uma velocidade maior, a temperatura utilizada foi de 95 °C. Para favorecer o crescimento das partículas, através do favorecimento da convecção das espécies em solução, a velocidade de agitação utilizada foi de 1150 rpm.

Na Figura 30 são apresentadas as distribuições de tamanho para as duas sínteses, calculadas a partir da contagem das partículas nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, Figura 31. Ambas apresentam tamanhos médios e distribuições de tamanhos próximos, 38.8 ± 6.8 nm para a cit-AuNP e 39.9 ± 5.6 nm para a ceto-AuNP. Contudo a síntese cit-AuNP apresenta uma população ligeiramente maior de partículas com diâmetros na faixa de 50 a 80 nm.

Figura 30: Distribuição de tamanho para as partículas ceto-AuNP (A) e cit-AuNP (B).

As imagens de MEV, Figura 31, mostram a formação de partículas quase esféricas, o que, segundo a discussão apresentada no Capítulo 4.3.2, sugere uma separação da etapa de crescimento e desagregação.

Figura 31: Imagens de MEV das partículas ceto-AuNP (A) e cit-AuNP (B).

A cinética de variação do espectro RGB mostra que para a ceto-AuNP, a etapa de redução/nucleação é mais rápida em relação a síntese cit-AuNP, provavelmente devido a maior velocidade de adição de citrato, região I da Figura 32 A e B. Como esperado, a etapa de aglomeração dos núcleos, formando os fios, é mais rápida para a síntese com menor concentração de citrato, devido a maior adsorção de $[\text{AuCl}_4]^-$ na superfície dos núcleos, região II da Figura 32 A e B.

Figura 32 Curva de variação do espectro RGB para as sínteses cit-AuNP (A) e ceto-AuNP (B).

Para a síntese da cit-AuNP, o crescimento dos fios começa em tempos menores em relação à síntese ceto-AuNP, região III da Figura 32 A e B. Além disso o processo de desagregação e crescimento das partículas isoladas, região IV da Figura 32 A e B, também é mais rápido para a cit-AuNP. Essas diferenças devem ser causadas pelo maior valor de supersaturação durante a etapa de crescimento, devido a maior concentração de citrato na síntese cit-AuNP. Em ambas as sínteses não observou-se uma alteração na taxa de crescimento em tempos longos, região V da Figura 32 A e B, indicando que a reação de redução do ouro pela acetona não ocorre em grande extensão.

Conclui-se que, na síntese da ceto-AuNP uma etapa de nucleação mais rápida é contrabalanceada com um crescimento mais lento. Já na síntese cit-AuNP o controle da nucleação, através da taxa de adição de citrato, é compensado por um crescimento mais acelerado. Dessa forma, ambas sínteses levam ao mesmo tamanho de partículas, porém com condições experimentais diferentes. Isso tem um grande impacto nas propriedades ópticas e da superfície das partículas, conforme será discutido nos próximos capítulos.

4.4 Conclusões

Os resultados obtidos estão de acordo com os observados por diferentes grupos nas ultimas 5 décadas de estudos em síntese de AuNPs. Mostram pela primeira vez a utilização de análise de imagens em tempo real no estudo do mecanismo de formação de nanopartículas de ouro. Como um primeiro estudo foi possível realizar uma análise qualitativa da cinética dos processos, sendo possível a identificação de diferentes etapas e suas consequências para a morfologia final das partículas. Dessa forma o mecanismo de formação das AuNPs pode ser separado em cinco etapas: redução/nucleação, aglomeração, crescimento, desagregação e crescimento.

Uma etapa de redução/nucleação mais rápida tem um grande efeito na formação de partículas menores e monodispersas, devido ao controle da supersaturação inicial. A etapa de aglomeração influencia diretamente na razão de aspecto das partículas, de forma que quanto mais rápida for a aglomeração, maior a tendência de formação de partículas anisotrópicas. Além disso a separação entre a etapa de crescimento e desagregação induz à formação de partículas mais esféricas. Enquanto que a ocorrência simultânea desses processos tende a gerar partículas planares. Porém a real força motriz para o crescimento anisotrópico das partículas, para esse sistema, ainda é desconhecida e deve ser alvo de estudos mais aprofundados.

Para um grande excesso de citrato o mecanismo de formação das AuNPs aproxima-se do mecanismo clássico apresentando somente duas etapas, redução/nucleação e crescimento. A ausência de aglomeração, causada pela adsorção do citrato na superfície dos clusters, leva a formação de partículas mais esféricas. Portanto, através da variação da concentração de citrato pode-se controlar a forma das partículas.

Os estudos apresentados nesse capítulo mostram que apesar da simplicidade do método de Turkevich, o controle de forma e tamanho das partículas é complexo, devido à existência de diferentes processos ocorrendo simultaneamente. O estudo em tempo real da síntese de nanopartículas através da análise de imagens mostrou-se ser uma técnica simples e de baixo custo, capaz de fornecer informações mais detalhadas, não obtidas com as técnicas mais sofisticadas. Isso possibilitou um entendimento mais profundo dos processos envolvidos na formação dos cristais, levando a um controle mais preciso do processo como um todo e um ajuste mais fino das propriedades das partículas como tamanho e forma.

5 Propriedades Ópticas de Nanopartículas de Ouro

5.1 Introdução

Nesse capítulo serão discutidas as propriedades ópticas de nanopartículas. Para isso serão introduzidos alguns conceitos sobre a Ressonância Plasmônica Localizada em Superfície, tempo de vida dos elétrons excitados da nanoestrutura metálica e a interação entre nanopartículas.

5.1.1 Ressonância Plasmônica de Superfície

As propriedades ópticas de nanopartículas metálicas surgem da interação da luz com nanoestruturas de dimensões menores que o seu comprimento de onda. Nessa condição considera-se que a partícula está sob a influência de um campo elétrico quase estático e homogêneo. Tal interação gera uma separação de cargas na superfície metálica, que apresentam uma forte força restauradora, originando um dipolo oscilante. Dessa forma são induzidas oscilações coerentes dos elétrons da banda de condução da nanoestrutura em ressonância com a radiação incidente, dando origem a um campo eletromagnético intensificado na superfície da nanoestrutura, Figura 33. A excitação não propagante dos elétrons de condução é conhecida como Ressonância Plasmônica Localizada em Superfície (LSPR – *Localized Surface Plasmons Resonance*).^{13,114–116}

Figura 33: Dipolo oscilante induzido por radiação eletromagnética em nanopartículas metálicas.

Nanopartículas metálicas, principalmente de ouro e prata, têm recebido maior atenção por apresentarem SPR na região de comprimentos de onda do visível.^{117,118}

Os plasmons de superfície excitados podem decair radiativamente e não radiativamente, dando origem a um espalhamento e absorção intensificados na região do comprimento de onda de ressonância. Essas propriedades são incorporadas no espectro de extinção das nanopartículas, no qual a absorbância é dependente da seção de choque de extinção, σ_{ext} .

O primeiro tratamento teórico das propriedades de uma nanopartícula esférica foi feito pelo físico alemão Gustave Mie.¹¹⁹ Resolvendo as equações de Maxwell para uma onda eletromagnética interagindo com esferas, que apresentam a constante dielétrica dependente da frequência da radiação incidente ($\varepsilon = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$).

Para esferas menores que 100 nm pode-se considerar a aproximação quase estática, na qual a fase do campo eletromagnético oscilante é constante em todo volume da partícula. Nessa aproximação, o campo eletromagnético gerado pode ser obtido através da resolução da equação de Laplace ($\nabla^2\Phi = 0$), em que Φ é o potencial elétrico e está relacionado com o campo elétrico ($E = -\nabla\Phi$). O campo elétrico gerado dentro da partícula e fora da partícula são dados pela Equação 16 e Equação 17, respectivamente, onde ε_m é a constante dielétrica do meio e ε a constante dielétrica da partícula, R é o raio da partícula, r é um ponto no qual é medido o campo e θ é o ângulo entre o vetor posição r e o eixo z . Para o campo interno $r < R$, para o campo externo $r > R$.

$$E_{in} = -\frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} E_0 r \cos\theta$$

Equação 16

$$E_{out} = -E_0 r \cos\theta + \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + \varepsilon_m} E_0 R^3 \frac{\cos\theta}{r^2}$$

Equação 17

Fisicamente E_{out} descreve a sobreposição do campo aplicado e do campo gerado pelo dipolo induzido na partícula, dado pela Equação 18, onde α é a polarizabilidade da partícula. Mie derivou uma expressão para a seção de choque de extinção e espalhamento em relação a oscilações multipolares, Equação 19 a Equação 21.

$$p = \alpha \epsilon_m E_0$$

$$\alpha = 4\pi\epsilon_0 R^3 \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m}$$

Equação 18

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \text{Re}(a_L + b_L)$$

Equação 19

$$\sigma_{esp} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) (|a_L|^2 + |b_L|^2)$$

Equação 20

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

Equação 21

Na Equação 18 E_0 é o campo elétrico da radiação incidente, α a polarizabilidade da partícula. Nota-se que o campo induzido será máximo quando a constante dielétrica da partícula for igual a $-2\epsilon_m$, onde ϵ_m é a constante dielétrica do meio. Como a constante dielétrica da partícula depende da frequência da radiação incidente, o campo elétrico será máximo na condição de SPR.

Na Equação 19 e Equação 20 $k = 2\pi/\lambda$ é o vetor de onda. Devido a simetria do sistema, a_L e b_L são parâmetros expressos em termos de funções de Ricatti-Bessel, do índice de refração complexo da partícula, do índice de refração real do meio e do raio da partícula, L refere-se a ordem de excitação ($L=1$ para excitação dipolar, $L=2$ para excitações quadrupolares, Figura 34).

Para nanopartículas muito menores que o comprimento de onda da luz ($2r \ll \lambda$ ou $2r < \lambda_{\max}/10$) apenas as oscilações dipolares contribuem significativamente para a seção de choque de extinção.^{117,120} A teoria de Mie pode ser reduzida para a expressão apresentada na Equação 22, onde $V = (4\pi/3)R^3$ é o volume da partícula esférica, c é a velocidade da luz, e ϵ_m e $\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega)$ são as funções dielétricas do meio e da partícula, respectivamente. A condição de ressonância ocorre quando $\epsilon_1(\omega) = -2\epsilon_m$, se ϵ_2 for relativamente pequeno. Plotando σ_{ext} em função dos comprimentos de onda de excitação obtém-se o espectro de extinção da nanopartículas, incluindo as transições plasmônicas, Figura 34.

$$\sigma_{\text{ext}}(\omega) = 9 \frac{\omega}{c} \epsilon_m^{\frac{3}{2}} V \frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + \epsilon_2(\omega)^2}$$

Equação 22

Figura 34: Espectro de extinção de nanopartículas esféricas e sua dependência com o tamanho da partícula, obtidos através da teoria de Mie.

A teoria de Mie foca apenas em partículas esféricas. No caso de nanopartículas de diferentes formas, as contribuições anisotrópicas dos modos de polarização das partículas devem ser incluídas. O tratamento para esses casos pode ser feito através do método de Aproximação Discreta de Dipolos (Discrete Dipole Approximation-DDA), onde a nanopartícula é considerada como um arranjo cúbico de dipolos elétricos interagindo com a radiação incidente.^{121,122} Nele, cada dipolo é descrito pelo seu vetor de posição ($\mathbf{r}_i$) e sua polarizabilidade (α_i). A polarização

induzida pela interação com a luz é dada pela Equação 23, onde $\mathbf{E}_{loc,i}$ é a soma dos campos elétricos de todos outros N-1 dipolos.

$$\mathbf{P}_i = \alpha_i \mathbf{E}_{loc,i}(\mathbf{r}_i)$$

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

Equação 23

Na Equação 23, $\mathbf{k}$ é o vetor de onda e $\mathbf{E}_0$ é a amplitude do campo elétrico da luz. O segundo termo da expressão do campo local representa a matriz de interação dipolo-dipolo e pode ser escrita na forma:

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

$$j = 1, 2, \dots, N, j \neq i$$

Equação 24

Onde $\mathbf{r}_{ij}$ e r_{ij} são o vetor de posição relativa dipolo-dipolo e seu módulo, respectivamente. A Equação 24 gera um sistema de 3N equações lineares complexas que podem ser solucionadas para $\mathbf{P}_{ij}$. Dessa forma as seções de choque de extinção e absorção podem ser expressas em função de $\mathbf{P}_{ij}$, Equação 25, e a seção de choque de espalhamento pode ser calculada através da Equação 21.

$$\sigma_{ext} = \frac{4\pi k}{|\mathbf{E}_0|^2} \sum_{i=1}^N \text{Im}(\mathbf{E}_{loc,i}^* \cdot \mathbf{P}_i)$$

$$\sigma_{abs} = \frac{4\pi k}{|\mathbf{E}_0|^2} \sum_{i=1}^N \left(\text{Im}[\mathbf{P}_i \cdot (\alpha_i^{-1})^* \mathbf{P}_i] - \frac{2k^3}{3} |\mathbf{P}_i|^2 \right)$$

Equação 25

Recentemente Hermoso e colaboradores¹¹³ utilizaram essa abordagem para avaliar as propriedades ópticas de nanoprismas triangulares de Ag, Au e Cu de comprimento de aresta de 40, 60, 80 e 100 nm com uma espessura fixa de 10 nm. Eles mostraram a existência de modos

dipolares, quadrupolares e octopolares na região do visível, que apresentam um deslocamento para o vermelho conforme o tamanho dos discos é aumentado. Adicionalmente comprovaram a presença de campos elétricos mais intensificados nas pontas das nanoestruturas.

Métodos baseados em eletrodinâmica clássica, como a teoria de Mie e DDA, descrevem com precisão as propriedades de partículas maiores, onde os estados excitados formam quase uma estrutura contínua e, dessa forma, um grande número de transições inter e intrabandas contribuem para uma dada banda de absorção. Porém, em sistemas menores, a estrutura eletrônica tende a apresentar níveis discretos e as propriedades ópticas são definidas pelas transições eletrônicas entre esses níveis.

Recentemente, foram reportadas sínteses de nanopartículas de ouro com ligantes tiolados menores que 2 nm apresentando propriedades plasmônicas,^{123–125} indicando que os métodos clássicos falham na descrição das propriedades de tais clusters. Uma abordagem que vem sendo empregada é a utilização de métodos ab-initio, como por exemplo, a Teoria do Funcional de Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT), nos quais a estrutura eletrônica do cluster é considerada e o cálculo das propriedades do sistema é feito levando em consideração os potenciais de interação elétron-elétron, elétron-núcleo e núcleo-núcleo no hamiltoniano do sistema.^{41,42,126} Dessa forma é possível mostrar que as oscilações plasmônicas apresentam um certo caráter molecular, sendo compostas por transições d-sp e sp-sp, Figura 35.⁴¹ A principal desvantagem desse método é o alto custo computacional, limitando a modelagem a sistemas pequenos, constituídos por cerca de 200 átomos metálicos.¹²⁷

Figura 35: Orbitais moleculares (A) e espectro eletrônico (B) calculados para um cluster de Au_{20} . Adaptado da referência ⁴¹.

5.1.2 Tempo de Vida dos Plasmons

O tempo de vida dos plasmons está correlacionado com a coerência das oscilações plasmônicas, que por sua vez dependem dos processos de amortecimento radiativos e não radiativos. O amortecimento radiativo está relacionado ao decaimento dos elétrons em fótons, sendo dominante em partículas de diâmetros maiores do que 50 nm. Já o amortecimento não-radiativo está relacionado aos processos de espalhamento elétron-fónon, elétron-elétron, elétron-defeito, elétron-superfície e a formação de pares elétron-buraco criados devido a excitação de transições inter e intrabandas. Os processos de decaimento não-radiativos são mais eficientes em partículas pequenas, tipicamente menores que 20 nm.

O tratamento matemático desses processos é feito considerando uma função dielétrica do material dependente do tamanho das partículas, a partir de um determinado raio crítico, de aproximadamente 20 nm. Essa dependência aparece devido à limitação do caminho livre dos elétrons na banda de condução do metal pela dimensão da partícula. O valor típico de caminho livre dos elétrons no ouro e na prata variam na ordem de 40-50 nm.¹²⁸ Portanto, para partículas

pequenas, os elétrons atingem a superfície e são espalhados mais rapidamente. Dessa forma, a coerência das oscilações é perdida e o tempo de vida dos plasmons diminui. Como consequência o tempo de vida dos plasmons é diretamente proporcional ao raio das partículas.

A largura da banda plasmônica está correlacionada aos processos de decaimento através do tempo de vida, ou tempo de defasagem total (T_2), dos plasmons, Equação 26.

$$\Gamma = \frac{2\hbar}{T_2}$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2^*}$$

Equação 26

T_1 descreve o tempo de relaxação da população e depende dos processos de decaimento radiativo e não-radiativo. T_2^* é o tempo de relaxação puro dependente apenas das colisões elásticas dos elétrons, nas quais não há mudança da energia dos elétrons, apenas do seu vetor de onda. Tipicamente, para nanopartículas de ouro, os valores de T_2 calculados estão na faixa de 2 a 10 fs, dependendo do tamanho e do ambiente químico ao redor da partícula.

A largura da banda pode ser calculada pela Equação 27, considerando a constante dielétrica como sendo a soma da contribuição das transições interbandas e da contribuição dos elétrons livres, dada pelo modelo de Drude, Equação 28.¹¹⁴

$$\Gamma = \frac{2\varepsilon_2}{\sqrt{(\partial\varepsilon_1/\partial\omega)^2 + (\partial\varepsilon_2/\partial\omega)^2}}$$

Equação 27

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1 + i\varepsilon_2 = \varepsilon_{ib} + \varepsilon_D$$

$$\varepsilon_D = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega}$$

Equação 28

Onde ω_p é a frequência de plasmon, ω é a frequência da radiação incidente e γ é introduzida como uma constante de amortecimento fenomenológica que leva em consideração processos de espalhamentos elétron-elétron (e-e), elétron-fonon (e-f) e elétron-defeito (e-d). O espalhamento elétron-superfície deve ser contabilizado somando um termo inversamente proporcional ao caminho livre do elétron (L_{eff}), Equação 29.^{114,117}

$$\gamma(r) = \gamma_0 + \frac{Av_f}{L_{eff}}$$

$$\gamma_0 = \tau_{e-e}^{-1} + \tau_{e-f}^{-1} + \tau_{e-d}^{-1}$$

Equação 29

Onde v_f é a velocidade do elétron no nível de Fermi e A depende do processo de espalhamento. L_{eff} depende do tamanho e forma da partícula e pode ser aproximado pelo volume (V) e pela área superficial (S). Dessa forma L_{eff} será dado por $L_{eff} = 4V/S$.

Na região do infra-vermelho próximo, onde as transições interbandas podem ser desconsideradas, no caso do ouro e da prata, a largura da banda será expressa apenas em função da constante de amortecimento $\gamma(r)$, Equação 30. Porém na região do visível, as transições interbandas devem ser consideradas e a largura de banda será dada pela Equação 31.

$$\Gamma = \gamma_0 + \frac{Av_f}{L_{eff}}$$

Equação 30

$$\Gamma = \frac{2\varepsilon_2}{|\partial\varepsilon_1/\partial\omega|} + \frac{2\omega_p^2/\omega^3}{|\partial\varepsilon_1/\partial\omega|} \frac{Av_f}{L_{eff}}$$

Equação 31

O primeiro termo da direita da Equação 31 é a contribuição das transições e o segundo engloba o espalhamento elétron-superfície. Quando a excitação é feita próxima da frequência de plasmon, cerca de 530 nm para o ouro, o termo $\frac{2\omega_p^2/\omega^3}{|\partial\epsilon_1/\partial\omega|}$ tende a 1 e a contribuição do espalhamento elétron-superfície é essencialmente a mesma, considerando ou não a contribuição das transições internas das nanopartículas.

Esse tratamento descreve a dependência da largura da banda plasmônica com os processos intrínsecos das partículas, porém o ambiente químico ao redor das partículas pode apresentar uma influência na largura e posição da ressonância plasmônica.

Moléculas que apresentam orbitais de fronteira com simetria e energias adequadas, podem apresentar transições de transferência de carga do nível de Fermi para o LUMO, ou do HOMO para o nível de Fermi. Quanto menor for a diferença entre os níveis de energia do doador e do aceptor mais forte será o acoplamento, aumentando a probabilidade de ocorrência de transições. Essas transições causam a perda de coerência dos elétrons excitados levando a uma banda mais larga e consequentemente um tempo de vida da oscilação plasmônica menor.

5.1.3 Acoplamento Plasmônico

As mudanças de cor de soluções de nanopartículas, pela adição de eletrólitos ou certas moléculas, é um fenômeno que vem despertando grande interesse. Tais mudanças são acarretadas devido à quebra de estabilidade das partículas levando à agregação das mesmas.^{129–}

132

A interação entre as partículas leva a um deslocamento da frequência plasmônica, causando as mudanças de cor observadas. Para partículas pequenas, tais interações podem ser aproximadas como dipolos interagindo mutualmente entre si. Considerando partículas de

tamanho r em arranjos de uma ou duas dimensões, para que aproximação de dipolos seja válida, a separação entre as partículas (d) deve ser muito maior que o tamanho das mesmas.

Quando d é muito menor que o comprimento de onda da radiação incidente as interações de campo próximo são dominantes e apresentam uma dependência com d^{-3} . Nesse caso as partículas são consideradas como dipolos interagindo devido a sobreposição dos campos eletromagnéticos próximos à superfície, gerando um campo intensificado na região entre as partículas, os *hot-spots*. Essa dependência com d^{-3} faz com que uma separação de 150 nm seja suficiente para que partículas de 50 nm se comportem como partículas isoladas.

Para separações grandes, acoplamentos de campos distantes, originados da difração da luz pelas partículas, são dominantes e apresentam uma dependência com d^{-1} . Tais acoplamentos apresentam forte influência na forma da banda plasmônica, modificando tanto a frequência de ressonância, como a largura da banda.¹³¹

Utilizando o modelo dipolar, pode-se determinar o deslocamento da ressonância considerando as interações coulômbicas associadas a polarização das partículas. Dependendo da polarização da luz incidente, a força restauradora dos elétrons oscilantes em cada partícula pode diminuir ou aumentar, causando um deslocamento dos modos transversais para o azul e para o vermelho dos modos longitudinais, Figura 36.

Figura 36: Acoplamento entre os dipolos de nanopartículas. Adaptado da referência ¹³

Um dos principais modelos para explicar a interação entre as nanopartículas em estruturas complexas, descreve as propriedades do sistema como uma combinação linear das ressonâncias plasmônicas dos componentes elementares. Esse modelo é conhecido como hibridização de plasmons e é construído de maneira análoga ao modelo de criação de orbitais moleculares, a partir dos orbitais atômicos. Dessa forma, os modos plasmônicos hibridizados são resultantes da sobreposição dos modos primitivos individuais.^{131,133}

Nesse modelo, os elétrons da banda de condução são tratados como sendo um fluido incompressível de densidade uniforme, confinado em uma matriz positiva e uniforme, descrita pela sua função dielétrica. As deformações do fluido, causadas pelas interações entre os plasmons via potencial de Coulomb, são descritas pelo seu campo de velocidades, que representa a velocidade de um certo volume de elétrons em determinadas posições. Devido à incompressibilidade do gás de elétrons as deformações levam a uma redistribuição das cargas superficiais da nanoestrutura.

Portanto, de maneira análoga à teoria de orbitais moleculares, o modo plasmônico coletivo que representa a interação dos dipolos ($L=1$), é desdobrado em um modo de energia mais baixa e outro mais alta.

O modo que aparece deslocado para o vermelho é dito como o modo “ligante”, ou modos claros. Esse apresenta os dipolos alinhados longitudinalmente, resultando em um momento de dipolo induzido maior e uma intensificação do campo eletromagnético na região dos *hot-spots*, dominando as propriedades ópticas de dímeros de partículas, por exemplo. Os modos de maior energia, ou modos “anti-ligantes”, também chamados de modos escuros, apresentam os dipolos alinhados paralelamente resultando em um acoplamento baixo. Modos de maiores polaridades ($L>2$) são observados em partículas de cerca de 100 nm ou quando a distância interpartícula é muito pequena.

Figura 37: Acoplamento plasmônico descrito pela teoria de hibridização de plasmons. Adaptado da referência ¹³¹

O modelo de hibridização de plasmons apresenta uma boa descrição de sistemas onde a separação entre partículas é suficientemente grande, tipicamente acima de 8 nm, para que a transferência de elétrons entre as nanopartículas possa ser desconsiderada. Nesses casos o aumento do campo na região dos *hot-spots* é maior, conforme a separação entre as partículas diminui.

Entretanto, em distâncias menores que 8 nm uma separação condutora é estabelecida entre as partículas e a descrição do campo eletromagnético deve ser feita utilizando a mecânica quântica, incorporando os efeitos de tunelamento dos elétrons. Cálculos de teoria do funcional de densidade dependente do tempo (TD-DFT) e aproximação de densidade local dependente do tempo (TD-LDA) mostram que para separações menores que 2 nm, o tunelamento de elétrons através da separação condutora, leva a uma diminuição do campo no *hot-spot*, em relação ao tratamento com o modelo de hibridização, Figura 38.^{134–137}

Figura 38: Comparação entre o tratamento por hibridização de plasmons (curva vermelha) e o modelo quântico (curva azul) para o acoplamento plasmônico. Retirado da referência ¹³⁷

5.2 Parte Experimental

A caracterização das propriedades ópticas das nanopartículas foi realizada por Microscopia Hiperespectral de Campo Escuro (MHCE), através da análise do espectro de espalhamento de nanopartículas isoladas e agregadas. A descrição aprofundada da técnica é mostrada no Capítulo 3.1.6. Para a aquisição das imagens, as AuNPs foram imobilizadas em um vidro modificado com 3-animopropiltrimetoxissilano (APTS), de acordo com o procedimento a seguir.

Lâminas ultra-limpas para microscopia com dimensões de 8.5 x 3.5 cm e espessura de 1 mm (glass B NEXTERION®) foram mergulhadas em álcool isopropílico, mantidos em banho de ultrassom por 20 minutos e secos utilizando papel próprio para limpar lentes. Em seguida, as lâminas foram submersas em solução 5% (v/v) de APTS em clorofórmio por 3 minutos e lavadas cinco vezes com água ultra-pura. O vidro modificado com APTS foi sinterizado por 2 horas a 180°C. Após resfriadas a temperatura ambiente, as lâminas foram secas sob fluxo de N₂. Os filmes de

AuNP sobre o vidro modificado com APTS foram feitos por *dropping cast*, depositando sobre o vidro 5 μL de soluções de AuNPs altamente diluídas. Sobre essa gota foi colocado um *cover slip* ultra limpo (NEXTERION®) e a amostra foi selada com fita adesiva e esmalte para evitar a penetração de gotas de óleo durante a aquisição das imagens hiperespectrais. Para a análise das interações entre as partículas, 5 μL de soluções de AuNP contendo NaCl (3mmolL^{-1}) foram depositados sobre o vidro com APTS e selados conforme descrito anteriormente.

Para o estudo do acoplamento plasmônico, a uma solução de cit-AuNP foram adicionadas quantidades diferentes de soluções 1molL^{-1} de sais de halogênios (NaF, NaCl, NaBr e NaI) e estudadas as mudanças no espectro eletrônico. Os espectros foram adquiridos em um tempo total de 30 minutos com um intervalo de 30 segundos entre cada aquisição e são mostrados os espectros a cada dois minutos para facilitar a visualização.

Adicionalmente, os espectros de espalhamento das partículas isoladas e agregadas foram comparados com os espectros de extinção medidos em dispersão aquosa das AuNP.

5.3 Resultados e Discussão

A discussão dos resultados será dividida em três partes. Primeiramente serão discutidas as propriedades ópticas das partículas, sintetizadas de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 4, com base na análise de seus espectros de extinção e espalhamento e de imagens de microscopia hiperespectral de campo escuro, conforme apresentado no Capítulo 3.1.6. Na segunda parte serão discutidos os efeitos de amortecimento para o tempo de vida dos plasmons, a partir da análise da largura de banda a meia altura. Na terceira parte serão analisados os efeitos de acoplamento plasmônico.

5.3.1 Ressonância Plasmônica de Superfície

As propriedades ópticas das AuNP levam a processos de absorção e espalhamentos intensificados, conforme discutido no Capítulo 5.1.1. Dessa forma, as cores observadas dependem do tamanho, forma e distribuição de tamanhos das AuNPs. Partículas de aproximadamente 20 nm apresentam uma coloração vermelha rubi e conforme aumentam de tamanho a cor observada passa para roxo e azul. Na Figura 39 são mostradas fotos das partículas sintetizadas pelo procedimento descrito no Capítulo 4. Como as seções de choque de absorção e de espalhamento das AuNP são diferentes, a cor observada quando a luz é transmitida pela dispersão de AuNP, Figura 39A, é diferente da cor observada quando a luz é espalhada, Figura 39B.

Figura 39: Foto das nanopartículas de ouro sintetizadas utilizando o planejamento fatorial. A numeração indicada está de acordo com os ensaios detalhados na Tabela 1. Em A, a iluminação é feita por trás, portanto observa-se a radiação transmitida através da dispersão de AuNP. Em B, a iluminação é feita pela frente, e observa-se a radiação espalhada pelas partículas.

Dependendo do método de síntese as AuNPs apresentam tamanhos e formas diferentes, conforme discutido no Capítulo 4.3.1, e tais diferenças morfológicas levam à variações das propriedades ópticas. Como pode ser visto na Figura 39, partículas esféricas com diâmetros variando de 20 a 40 nm, ensaios 5 a 8 e 13 a 16, apresentam contribuições de absorção e espalhamentos de luz próximas. Sendo assim as cores observadas por transmissão ou espalhamento de luz apresentam composições semelhantes. As partículas de tamanhos mais

próximos de 20 nm (ensaios 8 e 16) apresentam uma coloração bem avermelhada, tanto por espalhamento quanto por transmissão, indicando uma intensidade de absorção maior na região de comprimentos de onda da radiação verde.

Nanopartículas maiores, em torno de 35 nm, apresentam uma coloração tendendo para o roxo. Isto é devido ao aumento de tamanho e de distribuição de tamanhos, fazendo com que haja uma certa absorção e espalhamento de radiação na faixa do vermelho. Já partículas com cerca de 100 nm, ensaios 1 a 4 e 9 a 12, apresentam uma contribuição de espalhamento mais intensa, como pode ser visto pelo aspecto mais turvo das soluções, quando comparada com as partículas menores, Figura 39. Além disso, por transmissão, apresentam uma coloração azulada, indicando uma maior absorção na região do vermelho.

Esses fatos podem ser comprovados pela interpretação dos espectros de extinção (espalhamento + absorção) e de espalhamento das AuNPs. Na Figura 40, são mostrados os espectros de extinção das partículas sintetizadas, utilizando o planejamento fatorial. Partículas que possuem uma coloração mais avermelhada apresentam maior absorção na região do verde, enquanto que partículas com coloração azulada, absorvem em uma faixa ampla do vermelho.

Figura 40: Espectros de Extinção das AuNP. (A) Ensaios 1 a 4, (B) ensaios 5 a 8, (C) ensaios 9 a 12, (D) ensaios 13 a 16.

As partículas sintetizadas nos ensaios 1 a 4 e 9 a 12 possuem formas mais discoidais e uma grande distribuição de tamanhos, levando a propriedades ópticas heterogêneas. Tais propriedades são identificadas pela presença de bandas de extinção largas com múltiplos máximos na região de 500 a 1000 nm. Partículas que apresentam maior desvio padrão da média de tamanhos, apresentam bandas mais alargadas, ensaios 2, 9 e 10. Além disso, devido à forma discoidal há uma absorção ligeiramente maior na região entre 250 a 500 nm.^{112,113}

As sínteses que apresentaram maior formação de partículas esféricas, ensaios 5 a 8 e 13 a 16, detêm apenas uma banda mais fina na região de 500 a 600 nm, atribuída ao modo dipolar da ressonância plasmônica. Nesses casos, a largura da banda dependerá da distribuição de tamanhos das partículas, uma vez que o espectro de extinção é adquirido a partir de uma dispersão de AuNP, e estas estão em constante movimento Browniano. Portanto, o espectro final apresenta uma contribuição média de todas as partículas que passam no volume irradiado durante o tempo de aquisição dos dados. Como pode ser observado na Figura 40, as amostras que

apresentam o menor desvio padrão em relação aos tamanhos apresentam menor largura de banda, ensaios 7 e 16.

Nas sínteses realizadas com grande excesso de citrato (7 e 4 vezes) foi observado uma diminuição do tamanho médio das AuNP para cerca de 10 nm. Essa diminuição leva a um deslocamento para o azul da banda plasmônica, devido ao aumento das forças restauradoras, que aumenta a frequência de oscilação dos plasmons, Figura 41. Para a síntese com 14 vezes de excesso de citrato o deslocamento é ligeiramente menor, evidenciando um tamanho de partículas maior.

Como mostrado na caracterização morfológica e dos mecanismos de formação das AuNPs, Capítulo 4, um grande excesso de citrato faz com que a cinética de crescimento seja mais lenta, aumentando ligeiramente o tamanho final das partículas. Há também uma diminuição da absorvância e uma linha base próxima de zero, em comparação com as partículas das sínteses 1 a 16, Figura 40. Tais efeitos são causados pela diminuição da seção de choque de espalhamento devido a diminuição do tamanho. Portanto o espectro observado para as partículas de 10 nm é constituído majoritariamente pela contribuição da seção de choque de absorção.

Figura 41: Espectro de extinção das sínteses realizadas fora do planejamento fatorial. (A) cit-AuNP e cetoAuNP. (B) Sínteses com excesso de citrato.

As sínteses cit-AuNP e ceto-AuNP, planejadas para que as partículas tivessem o mesmo tamanho (Figura 30), partindo de condições de síntese diferentes, apresentam propriedades

ópticas levemente diferentes, Figura 41. Para a cet-AuNP o máximo de extinção mostra um deslocamento batocrômico em relação a cit-AuNP. Pela distribuição de tamanhos de ambas, nota-se que a cet-AuNP apresenta uma população maior entre 40 e 50 nm, ocasionando o deslocamento observado. Já a cit-AuNP apresenta um máximo da distribuição normal em cerca de 35 nm, fazendo com que a banda de LSPR apresente um pequeno deslocamento hipsocrômico. Porém, as cit-AuNP possuem um maior número de partículas com diâmetros acima de 50 nm, causando um leve alargamento da banda na região entre 600 e 700 nm.

Para exemplificar as diferentes contribuições das seções de choque de absorção e espalhamento, na Figura 42 são mostradas as seções de choque teóricas para diferentes tamanhos de AuNPs em água, calculadas pela teoria de Mie.¹³⁸ Como pode ser visto há uma maior diminuição da seção de choque de espalhamento com a diminuição do tamanho. Dessa forma o espectro de extinção de partículas menores que 40 nm será aproximadamente igual à seção de choque de absorção. Por outro lado, o espectro de extinção de partículas maiores que 100 nm é dominado pelo espalhamento.

Figura 42: Seções de Choque calculadas para diferentes tamanhos de AuNP utilizando a teoria Mie. (A) Seção de choque da absorção. (B) Seção de choque de espalhamento. (C) Seção de choque de extinção.

5.3.1.1 Atribuição dos Modos Plasmônicos

Deconvoluindo os espectros de extinção das diferentes AuNP pode-se fazer uma atribuição mais precisa dos modos das oscilações plasmônicas, Figura 43. Para simplificação da

discussão, essa análise será focada na comparação dos espectros das partículas do ensaio 2, 16, das com 7 vezes de excesso de citrato e das cit-AuNP e ceto-AuNP. A amostra 2 é interessante por apresentar maior proporção de discos, enquanto que a amostra 16 apresenta partículas com uma razão de aspecto mais próxima de 1 e uma menor distribuição de tamanhos. As amostras cit-AuNP e ceto-AuNP serão discutidas, pois serão importantes na discussão dos Capítulos 0 e 0.

Pequenas nanopartículas esféricas apresentam uma separação isotrópica de cargas na superfície gerando um modo dipolar de oscilação dos plasmons.¹¹⁷ Enquanto que partículas maiores (>100 nm) podem apresentar modos quadrupolares.¹¹⁷ Em nanobastões, por exemplo, é possível gerar dois modos dipolares com separação de cargas ao longo dos seus eixos transversal e longitudinal, gerando duas bandas de extinção no espectro de suspensões de nanobastões de ouro, cuja posição depende da razão de aspecto e das dimensões dos mesmos.

Para partículas planas, como discos ou prismas triangulares, existem dois modos no plano e dois fora do plano, sendo dois dipolos e dois quadrupolos. O espectro eletrônico de nanoprismas triangulares de prata, com 100 nm de aresta e 16 nm de espessura é marcado pela existência dos modos dipolares no plano e fora dele em cerca de 800 e 410 nm, respectivamente. Já os modos quadruplos estão em 470 nm, para o modo no plano, e 340 nm para o modo fora do plano.^{113,139–}

141

Liz-Marzan e colaboradores mostraram, teórica e experimentalmente, que o campo eletromagnético concentra-se nas pontas dos triângulos para os modos dipolares e nas faces planas para os modos quadrupolares.¹³⁹ Grasseschi et al. mostram um deslocamento para o azul dos modos, de acordo com o grau de desgaste das pontas dos triângulos, atingindo o máximo de deslocamento para discos hexagonais, sendo que o deslocamento é maior para os modos dipolares do que para os modos quadrupolares.¹¹²

Sabendo-se disso, espera-se que os discos sintetizados no ensaio 2 apresentem dois modos dipolares no plano, referentes a separação de cargas ao longo dos eixos transversal e

longitudinal na região de 600 a 900 nm. Um modo dipolar fora do plano em 500nm e modos quadrupolares na região abaixo de 450 nm. Esses modos devem apresentar um deslocamento para o azul em relação aos modos calculados por Hermoso et al.,¹¹³ devido a presença de pontas mais arredondadas, o que aumenta a força restauradora e consequentemente a frequência das oscilações.

Figura 43: Deconvolução dos espectros de extinção das AuNP em funções gaussianas. (A) ensaio 16, (B) 7 x Cit. (C) ensaio 2. (D) ceto-AuNP. (E) cit-AuNP.

O espectro de extinção das partículas do ensaio 2 pode ser deconvoluído em 8 gaussianas, Figura 43C. Entre 500 e 100 nm temos os modos dipolares no plano e fora do plano. Em 400 nm

há uma banda larga que pode ser atribuída aos modos quadrupolares e octopolares, que encontram-se sobrepostos e apresentam baixa intensidade, devido aos efeitos de amortecimento dos plasmons causados pela existência de transições inter bandas. A banda em 310 nm pode ser atribuída aos íons de ouro restantes ao final da reação, uma vez que a síntese é realizada abaixo da condição estequiométrica. A atribuição exata dos modos dos discos será retomada na análise dos espectros de espalhamento das AuNPs.

O espectro de extinção da amostra 16 pode ser deconvoluido em três funções gaussianas, Figura 43A. Tal assimetria da banda de ressonância plasmônica pode ser causada pelo fato das partículas não serem totalmente esféricas, apresentando uma razão de aspecto entre 1.1 e 1.3, além do efeito da distribuição de tamanhos. Já para a síntese com excesso de citrato, o espectro de extinção pode ser aproximado por apenas uma função gaussiana, Figura 43B, indicando uma menor distribuição de tamanhos e uma razão de aspecto mais próxima de 1, como mencionado anteriormente.

Apesar das partículas cit-AuNP e ceto-AuNP apresentarem tamanhos e distribuições de tamanhos muito próximos, o espectro de extinção das ceto-AuNP pode ser aproximado por uma função gaussiana, Figura 43D, enquanto que o espectro das cit-AuNP por duas gaussianas, Figura 43E. Como discutido anteriormente, a maior proporção de partículas acima de 50 nm na amostra cit-AuNP, causa um alargamento da banda, Figura 41A, tornando-a assimétrica.

As características das AuNPs discutidas até esse ponto são propriedades médias, ou seja, apresentam contribuição de todas partículas presentes no volume irradiado, medidas em suspensão, estando sujeitas a fatores como distribuição de tamanho e movimento Browniano das partículas. Uma caracterização mais aprofundada pode ser feita por microscopia hiperspectral de campo escuro (MHCE).

Como foi mostrado no Capítulo 3.1.6, a MHCE possibilita a aquisição de imagens ópticas de campo escuro e imagens hiperespectrais. No arranjo de um microscópio de campo escuro a

abertura da lente objetiva é menor do que a abertura da lente condensadora, dessa forma não é captada nenhuma luz transmitida, apenas a luz espalhada em ângulos menores que a abertura numérica da lente objetiva. Dessa forma a imagem observada é dependente da eficiência de espalhamento da amostra.

Para as AuNPs a seção de choque de espalhamento é diretamente proporcional ao raio da partícula à sexta potência (r^6), segundo a teoria de Mie. Portanto para partículas menores que 20 nm, a eficiência de espalhamento é baixíssima, consequentemente a intensidade observada na imagem óptica de campo escuro também será baixa, Figura 44A. Conforme o tamanho das partículas aumenta, sua eficiência de espalhamento cresce, assim como a intensidade da radiação espalhada, atingindo um máximo para as partículas do ensaio 2, Figura 44E.

Figura 44: Imagens ópticas de microscopia de campo escuro das amostras com 7 vezes de excesso de citrato (A), amostra 16 (B), ceto-AuNP (C), cit-AuNP (D) e amostra 2 (E). Seção de choque de espalhamento para partículas esféricas calculas pela teoria de Mie (F).

Nas imagens ópticas de campo escuros, Figura 44 a Figura 48, para as partículas de 10 nm observa-se apenas partículas espalhando radiação de comprimento de onda referente a cor verde, Figura 45A. Já para AuNPs de tamanhos entre 20 e 60 nm experimentalmente observa-se que há tanto partículas espalhando no verde como no vermelho, sendo que visualmente a quantidade de partículas vermelhas nas amostras 16 (Figura 46A) e cit-AuNP (Figura 48A) é maior em relação a

ceto-AuNP (Figura 47A). A alta eficiência de espalhamento em todas as faixas de comprimentos de onda do visível faz com que a composição de cores para as partículas maiores que 100 nm seja mais complexa, como pode ser visto nas imagens ópticas do ensaio 2, Figura 44E.

Figura 45: (A) Imagem óptica de campo escuro, (B) Imagem hiperespectral e (C) espectros de espalhamento de AuNP de 10 nm

Figura 46: (A) Imagem óptica de campo escuro, (B) Imagem hiperespectral e (C) espectros de espalhamento de AuNP do ensaio 16

Figura 47: (A) Imagem óptica de campo escuro, (B) Imagem hiperespectral e espectros de espalhamento das partículas verdes (C) e vermelhas (D) da ceto-AuNP.

Figura 48: (A) Imagem óptica de campo escuro, (B) Imagem hiperespectral e espectros de espalhamento das partículas verdes (C) e vermelhas (D) da cit-AuNP.

O espectro de espalhamento das partículas entre 10 e 60 nm apresenta apenas uma banda, indicando a existência apenas de uma separação dipolar de cargas na superfície quando os plasmons são excitados.¹¹⁷ As AuNP de 10 nm apresentam apenas uma banda em cerca de 545 nm, Figura 45C. As partículas do ensaio 16, cit-AuNP e cet-AuNP apresentam propriedades semelhantes, há uma maior proporção de partículas com máximo da banda de espalhamento em torno de 560 e uma população pequena de partículas espalhando radiação de comprimento de onda de 630 nm, Figura 46C, Figura 47C e Figura 48C. Porém visualmente as partículas do ensaio 16 e citAuNP apresentam maior população de partículas vermelhas, em comparação com a amostra cet-AuNP.

Há um deslocamento batocrômico quando comparam-se os espectros de espalhamento, Figura 45C a Figura 48C, com os espectros de extinção Figura 40 e Figura 41. Existem dois motivos para este deslocamento. O primeiro é o fato da seção e choque de espalhamento, segundo a teoria Mie, apresentar uma dependência com o vetor de onda k , de k^4 , enquanto que a seção de choque de absorção é proporcional a k . Dessa forma os espectros de espalhamento das AuNPs serão deslocados para o vermelho em relação ao espectro de extinção. Considerando esferas de 45 nm em água esse deslocamento seria de aproximadamente 10 nm, Figura 49a.

A segunda razão é a mudança da constante dielétrica do meio. Como as partículas encontram-se depositadas no vidro, que por sua vez apresenta um índice de refração maior em

relação ao índice de refração da água, há um deslocamento dos modos plasmônicos para o vermelho. Porém, a constante dielétrica ao redor da partícula não é homogênea, uma vez que as partículas encontram-se em contato tanto com o vidro, como com a solução colocada entre as lâminas de microscopia no preparo de amostra. Dessa forma o deslocamento não é homogêneo e é difícil de ser previsto precisamente. Contudo, se considerarmos partículas esféricas de 45 nm, imersas em um meio homogêneo, de índice de refração igual a 1.52 (índice de refração padrão utilizado em lâminas para microscopia) o deslocamento seria de cerca de 23 nm, Figura 49b. Somando os dois efeitos o deslocamento total previsto seria próximo de 35 nm.

Figura 49: Seções de choque de extinção, absorção e espalhamentos, calculadas pela teoria de Mie para nanopartículas de ouro de 45 nm, em água, com índice de refração de 1.33 (a) e sílica com índice de refração de 1.52 (b).

A médias dos valores dos máximos de espalhamento para as diferentes partículas e sua comparação com o máximo observado nos respectivos espectros de extinção estão sumarizados na Tabela 5. Os deslocamentos observados, comparando apenas as partículas espalhando no verde, com os respectivos espectros de extinção, estão na faixa de 25 a 40 nm, condizentes com os valores calculados teoricamente. Como as partículas vermelhas apresentam um menor peso estatístico elas seriam mais responsáveis pelo alargamento da banda plasmônica no espectro de extinção, não contribuindo efetivamente para o comprimento de onda máximo.

Tabela 5: Valores de λ_{max} observados nos espectros de extinção e espalhamento da AuNP

	λ_{max} (extinção) / nm	λ_{max} (espalhamento) / nm (partículas verdes)	λ_{max} (espalhamento) / nm (partículas vermelhas)
7 x Cit	518	547,5 ± 5,9	-----
Ensaio 16	527	564,2 ± 8,8	633,7 ± 10,6
Cit-AuNP	525	560,9 ± 8,3	633,5 ± 11,4
Ceto-AuNP	534	558,3 ± 5,3	628,9 ± 9,6

As partículas do ensaio 2 apresentam propriedades ópticas mais heterogêneas, devido à alta distribuição de tamanhos e formas, conforme mostrado no capítulo anterior. Contudo alguns padrões mais significativos podem ser encontrados. Há duas populações de partículas mais relevantes, uma delas apresenta duas bandas bem distintas e intensas na região entre 500 e 900 nm e uma banda mais fraca entre 100 e 500 nm, Figura 50. Analisando as imagens de MEV é possível encontrar partículas com formas de bastões achatados, com alturas na faixa de 15 a 30 nm e comprimentos e larguras de aproximadamente 100 e 50 nm, respectivamente. Além disso, há partículas com alturas variando entre 15 e 20 nm e comprimentos e larguras próximos de 50-70 nm, Figura 23 e Figura 24.

Partículas com maior razão entre comprimento e largura, possuem dipolos no plano ao longo dos eixos transversal e longitudinal dos discos, dando origem a duas bandas no espectro de

espalhamento, na região acima de 500 nm. Pelo fato da altura ser menor que as outras dimensões, há a possibilidade de separações de cargas, gerando dipolos ou quadrupolos fora do plano da partícula, gerando um espalhamento e absorção intensificados na região abaixo de 500 nm. Portanto, os espectros de espalhamento que apresentam três bandas, podem ser atribuídos a partículas discoidais com uma maior razão entre largura e comprimento. A banda acima de 700 nm pode ser atribuída ao dipolo no plano no eixo longitudinal da partícula, a banda entre 500 e 600 nm, ao dipolo no plano no eixo transversal e a banda abaixo de 500 nm seria uma composição dos modos dipolares, e de maior ordem, fora do plano.

Figura 50: Imagens hiperspectrais de campo escuro e seus respectivos espectros de espalhamentos pra o ensaio 2. Juntamente são apresentadas algumas imagens de MEV de possíveis partículas responsáveis pelos espectros de espalhamento apresentados.

Quanto mais simétrica for a partícula, ou seja, quanto menor for a razão entre a largura e o comprimento, mais próxima estarão as bandas referentes aos dipolos no plano, até que haja apenas uma banda, quando a razão for próxima de 1. Como pode ser visto na Figura 50, os espectros que possuem apenas uma banda entre 500 e 600 nm podem ser atribuídos a esse tipo de partícula. Contudo deve-se notar que elas ainda apresentam uma banda abaixo de 500 nm, inexistente em partículas esféricas, indicando que tais partículas ainda apresentam uma morfologia discoidal.

Nas imagens hiperespectrais a reconstrução da imagem é feita a partir do espectro de espalhamento de cada pixel, considerando apenas um comprimento de onda para cada canal de cor RGB. Uma forma de analisar as imagens é através da decomposição das mesmas em três imagens cada uma contendo o valor de um canal RGB. Dessa forma é possível analisar a proporção de cada tipo de partícula e correlacionar com as propriedades ópticas médias medidas em solução.

Para que esse tipo de análise seja eficaz, esta deve ser feita apenas na imagem hiperespectral. Pois nesse caso é possível utilizar apenas a intensidade de um comprimento de onda específico como valor de entrada dos canais RGB, diferentemente da imagem óptica, conforme descrito no Capítulo 3.1.6. No caso, foram utilizados os comprimentos de onda de 465, 545 e 635 nm para os canais azul, verde e vermelhos, respectivamente, considerados comprimentos de onda padrão para reproduzir as imagens com coloração real.

Como as AuNPs isoladas de 10 a 40 nm apresentam bandas relativamente finas, com larguras de banda a meia altura entre 50 a 100 nm, cada partícula contribui efetivamente para apenas um dos canais na composição da imagem RGB. Por exemplo, partículas com $\lambda_{\text{máx}}$ entre 520 e 580 nm contribuem efetivamente para o canal verde. Enquanto que partículas com $\lambda_{\text{máx}}$ acima de 600 nm irão contribuir apenas para o canal vermelho, Figura 51.

Já na imagem óptica convencional a ccd utiliza faixas de comprimentos de onda mais amplas para cada canal de cor, havendo regiões de sobreposição dos diferentes canais. Nesse caso uma mesma partícula pode aparecer em mais de um canal de cor, superestimando a contagem de partículas. Na Figura 51 este problema é exemplificado utilizando partículas citAuNPs. Como pode ser visto, o tratamento da imagem óptica leva a uma superestimação do número de partículas, enquanto o tratamento da imagem hiperespectral leva a um valor mais compatível com o observado visualmente. Esse tipo de análise será importante para a discussão do efeito SERS das partículas, no Capítulo 6.

A contagem das partículas baseada nesse método é mostrada na Tabela 6, e as imagens utilizadas estão na Figura A 3 a Figura A 6 do Apêndice 10.2

Figura 51: Decomposição dos canais RGB das imagens ópticas e hiperespectral de campo escuro. Exemplo dos comprimentos de onda utilizados na composição da imagem hiperespectral em relação aos espectros de espalhamento. Comparação das análises com as cit-AuNPs.

Nas imagens das partículas de 10 nm, sintetizadas com sete vezes de excesso de citrato, foram encontradas apenas partículas verdes, justificando a baixa distribuição de tamanhos encontrada por espalhamento dinâmico de luz, Figura 29. As amostras 16 e cit-AuNP apresentam uma proporção de partículas verdes e vermelhas de 5:1, respectivamente. Enquanto que a partícula cet-AuNP apresenta proporção de 16:1, justificando o alargamento da banda

plasmônica observada no espectro de extinção das cit-AuNPs. Nessas amostras as contagens no canal azul podem ser atribuídas a bolhas de água presentes na amostra, cujo espectro encontra-se na Figura A 7 do Apêndice 10.2.

Tabela 6: Contagem de partículas a partir da decomposição dos canais RGB das imagens hiperespectrais para as diferentes AuNP.

	Vermelhas	Verdes	Azuis
7 x Cit	4	21815	42
Ensaio 16	321	1860	18
Cit-AuNP	1002	4758	9
Ceto-AuNP	132	2214	21
Ensaio 2	998	1224	1123

Conforme foi discutido neste capítulo, os nanodiscos sintetizados no ensaio 2, apresentam espalhamento intensificado na região dos três canais de cor. Foi calculada uma proporção de aproximadamente 1:1:1 de partículas espalhando no vermelho, verde e azul. Esse resultado mostra que essa síntese leva a um alto rendimento de partículas anisotrópicas, principalmente discos. Porém ainda devem ser feitos ajustes no método para gerar uma distribuição de tamanhos mais estreita.

O alto número de partículas contadas para a amostra feita com excesso de citrato, mostra a ocorrência de uma etapa de redução dos íons de Au^{+3} e de nucleação extremamente rápidas, gerando um elevado número de núcleos. Isto leva a uma queda brusca da supersaturação, com isso os núcleos crescem a taxas menores, atingindo tamanhos também menores. Corroborando com a discussão feita no Capítulo 4.3.2. Já para o ensaio 2, a etapa de nucleação gera poucos núcleos, devido à baixa concentração de citrato limitar a supersaturação do meio. Com a geração de menos núcleos a queda na supersaturação é menor ao final dessa etapa, e os núcleos crescem de forma mais acelerada, levando à formação de menos partículas porém, maiores.

5.3.2 Tempo de Vida dos Plasmons

Como mostrado na Seção 5.1.2 o tempo de vida dos plasmons é correlacionado com a largura da banda através dos diferentes processos de amortecimento. Para a sua análise, a largura de banda a meia altura foi estudada através da aproximação da banda plasmônica a uma função lorentziana, Equação 32, onde a largura da banda é dada pelo parâmetro w .

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x - x_c)^2 + w^2}$$

$A, w > 0$
offset: $y_0 = 0$
center: $x_c = 5$
width: $w = 2$
area: $A = 1$

$yc = y_0 + 2A/(w \cdot \pi)$

Equação 32

As curvas ajustadas são mostradas na Figura 52. O valor de R^2 para os ajustes variou tipicamente entre 0.96 a 0.99, exceto para os ajustes dos espectros das partículas sintetizadas com excesso de citrato que variou na faixa de 0.90. Nesse caso, a baixa correlação entre os dados experimentais e as curvas ajustadas ocorreu devido ao elevado ruído, presente, uma vez que a dimensão das partículas está no limite de resolução do equipamento.

Figura 52: Ajuste de curvas Lorentziana aos espectros de espalhamento das partículas (A) 7 x Cit, (B) ensaio 16, (C) cit-AuNP e (D) cet-AuNP.

As larguras de banda e os tempos de vida (T_2) calculados para as diferentes partículas, considerando uma contagem de aproximadamente 100 partículas para cada imagem, são apresentados na Tabela 7.

A largura da banda plasmônica é maior para as partículas menores de 10 nm, evidenciando a dependência com r^{-1} , conforme discutido no Capítulo 5.1.2. Sendo o aumento dos processos de espalhamento elétron-superfície a principal causa do alargamento.¹²⁸ A diminuição do caminho livre médio dos elétrons leva a diminuição do tempo de vida dos elétrons, devido à rápida perda de coerência dos mesmos ao chegarem à superfície.

Como mostrado na seção anterior, nas partículas do ensaio 16, cit-AuNP e cet-AuNP há duas populações. A primeira é constituída de partículas verdes, que apresentam uma largura média da banda plasmônica em torno de 70 nm. A amostra cet-AuNP possui um w médio de 68.2 nm, enquanto que as cit-AuNP de 70,9 nm. Como essas partículas apresentam tamanhos e

distribuições de tamanhos muito próximos essas diferenças podem ser causadas pela influência do ambiente químico ao redor da partícula nos processos de amortecimento dos plasmons.

Quando as partículas vermelhas são analisadas, encontra-se uma brusca diminuição da largura da banda para cerca de 50 nm. O caminho livre médio dos elétrons no nível de Fermi no ouro está entre 40 e 50 nm.^{118,128} Em partículas com dimensões menores, os processos de espalhamento elétron-superfície são mais eficientes, determinando o tempo de vida dos plasmons. Essa variação brusca no tempo de vida pode ser um indicativo de que as partículas vermelhas apresentam tamanhos maiores que 50 nm. Dessa forma, os processos de amortecimento dos elétrons na superfície são menos eficientes. Condizendo com a posição do máximo da banda. Mais uma vez as partículas ceto-AuNP apresentaram tempos de vidas menores em relação as partículas cit-AuNP

Tabela 7: Valores de largura de banda a meia altura (w) e tempo de vida (T_2) calculados para as diferentes partículas a partir da aproximação lorentziana.

	w / nm	σ_w	T_2 / fs	σ_{T_2}
7 x Cit	88,1	10,5	1,8	0,2
Ensaio 16_verde	72,6	10,4	2,3	0,4
Ensaio 16_vermelhas	53,0	5,4	4,0	0,5
citAuNP_verde	68,2	8,4	2,4	0,3
citAuNP_vermelhas	48,8	3,9	4,3	0,4
cetoAuNP_verdes	70,9	5,1	2,3	0,2
cetoAuNP_vermelhas	53,0	6,8	4,0	0,5

Outro fator que tem grande influência no tempo de vida dos plasmons é o ambiente químico ao redor das partículas. Ou seja, ligantes coordenados à superfície das partículas que possuem orbitais de fronteiras capazes de apresentar transições de transferência de carga (LMCT ou MLCT), causam a perda de coerência dos elétrons mais rapidamente.

A excitação de tais transições leva o elétron para regiões com constantes dielétricas diferentes, consequentemente a mobilidade do elétron é alterada e a fase das oscilações plasmônica é perdida. Isto causa um alargamento da banda e uma diminuição do tempo de vida

dos plasmons. Além de ter influência na posição do máximo devido às mudanças na constante dielétrica ao redor da superfície das partículas. Portanto a largura da banda pode ser um bom parâmetro para analisar a força de interação de diferentes ligantes com as NPs.

Para exemplificar esse fenômeno foi utilizado o ligante TMT (trimercaptotriazina), já estudados em trabalhos anteriores.^{25,142,143} Os valores médios de w e T_2 calculados são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 8: Tabela dos valores calculados de $\lambda_{max}(X_c)$, w e T_2 para amostra preparadas a partir de uma suspensão de AuNP contendo TMT $10^{-5} \text{ molL}^{-1}$.

	X_c / nm	w / nm	T_2 / fs
7 x Cit	$552,45 \pm 6,97$	$96,90 \pm 8,01$	$1,62 \pm 0,13$
Ceto-AuNP	$557,72 \pm 6,60$	$77,97 \pm 6,50$	$2,04 \pm 0,19$
Cit-AuNP	$558,85 \pm 7,90$	$75,89 \pm 7,10$	$2,15 \pm 0,21$

Para todas as partículas a largura média da banda plasmônica aumentou, diminuindo o tempo de vida do plasmon, evidenciando uma maior interação entre o TMT e a superfície do ouro em relação à interação entre o citrato e o ouro.

5.3.3 Acoplamento Plasmônico

O acoplamento plasmônico surge da interação entre partículas gerando uma sobreposição de campos eletromagnéticos na região entre estas. Considerando partículas esféricas na aproximação de dipolos, a interação entre as mesmas dá origem a um modo de menor energia, na qual os dipolos encontram-se alinhados e um modo de maior energia, na qual os dipolos se encontram paralelos.

Em suspensão, para que esse tipo de interação seja observada, a estabilidade das partículas deve ser quebrada, permitindo maior aproximação das mesmas. A estabilidade de coloides, em geral, está correlacionada ao balanço entre as forças atrativas entre as superfícies

das partículas e as forças repulsivas, provenientes da formação de uma atmosfera iônica ao redor das partículas. Essa atmosfera iônica é formada por duas regiões, uma formada por íons adsorvidos à superfície do coloide e outra por íons de cargas opostas. Essas regiões juntas são denominadas de dupla camada elétrica. Uma discussão sobre seus princípios básicos é apresentada no Anexo 11.1.

Alterações na concentração de íons em solução, ou seja, alterações na força iônica do meio levam a uma quebra desse balanço de forças, devido a alterações na composição e espessura da dupla camada elétrica. Dessa forma, a interação entre as partículas pode ser promovida através da adição de um eletrólito ao meio, como por exemplo NaCl. Outra possibilidade é diminuir a carga da dupla camada pela adição de moléculas neutras que possuam alta afinidade pela superfície da partícula.

Na Figura 53 a Figura 56 são mostrados os espectros de extinção de soluções contendo cit-AuNP e sais de halogênios (NaF, NaCl, NaBr e NaI) em diferentes concentrações. Para facilitar a visualização dos dados, são mostradas as mudanças no espectro eletrônico a cada dois minutos.

Ao adicionar 150 μ L de NaX, o surgimento de uma banda bem definida e larga com um máximo de absorção na região de 700 a 820 nm, nos quatro casos, indica que houve uma rápida agregação das nanopartículas, devido à uma brusca mudança da força iônica do meio. O subsequente deslocamento dessa banda para o vermelho e a diminuição da sua intensidade, mostram a formação de agregados mais densos e a posterior precipitação dos mesmos.

Adicionando 100 μ l de NaCl, NaBr ou NaI observa-se o mesmo padrão de agregação e precipitação das partículas observado na adição de 150 μ l do respectivo sal. Porém no caso do fluoreto a extensão da agregação e da precipitação é menor, uma vez que a banda de acoplamento plasmônico apresenta um menor deslocamento batocrômico e a diminuição da sua intensidade com o tempo é menor.

Já com a adição de 50 μL de eletrólito, em todos os casos, observa-se uma pequena agregação das partículas, sem a ocorrência de precipitação, uma vez que a força iônica é alta o suficiente para diminuir a distância entre partículas. Isto possibilita o acoplamento entre os plasmons de partículas vizinhas, sem fazer com que as forças de repulsão entre as duplas camadas elétricas de duas partículas vizinhas seja menor que as forças de atração entre suas superfícies.

Figura 53: Espectros de extinção de soluções contendo cit-AuNP e NaF em diferentes concentrações. Os espectros foram adquiridos em um tempo total de 30 minutos com um intervalo de 30 segundos entre cada aquisição e são mostrados os espectros a cada dois minutos para facilitar a visualização.

Figura 54: Espectros de extinção de soluções contendo cit-AuNP e NaCl em diferentes concentrações. Os espectros foram adquiridos em um tempo total de 30 minutos com um intervalo de 30 segundos entre cada aquisição e são mostrados os espectros a cada dois minutos para facilitar a visualização.

Figura 55: Espectros de extinção de soluções contendo cit-AuNP e NaBr em diferentes concentrações. Os espectros foram adquiridos em um tempo total de 30 minutos com um intervalo de 30 segundos entre cada aquisição e são mostrados os espectros a cada dois minutos para facilitar a visualização.

Figura 56: Espectros de extinção de soluções contendo cit-AuNP e NaI em diferentes concentrações. Os espectros foram adquiridos em um tempo total de 30 minutos com um intervalo de 30 segundos entre cada aquisição e são mostrados os espectros a cada dois minutos para facilitar a visualização.

Plotando junto os espectros com a mesma concentração dos diferentes sais, Figura 57, observa-se que há diferenças entre a posição do máximo de extinção para a banda de acoplamento plasmônico. Esta desloca-se para o vermelho conforme varia-se o eletrólito de NaF a NaI na série, indicando que a forma do agregado ou a distância entre as partículas é diferente dependendo da natureza do eletrólito utilizado. Para cada conjunto de espectros (a) 50 μL NaX, (b) 100 μL de NaX e (c) 150 μL de NaX a força iônica do meio é igual, já que a concentração de íons é a mesma e todos os sais são eletrólitos fortes e apresentam a mesma carga.

Portanto, os diferentes padrões de agregação e precipitação das cit-AuNP para diferentes sais de halogênios é mais um indício de que a interação entre o eletrólito e a superfície da partícula é diferente e que a agregação das mesmas não depende somente da força iônica do meio, mas

também da natureza do eletrólito e do tipo de interação do mesmo com a superfície do ouro. Esse conceito será aplicado no estudo da funcionalização das AuNPs discutido no Capítulo 7.

Figura 57: Comparação entre os espectros de extinção das cit-AuNPs após a adição de diferentes volumes de NaX 1 mol L^{-1} , $50\text{ }\mu\text{L}$ (a), $100\text{ }\mu\text{L}$ (b) e $150\text{ }\mu\text{L}$ (c).

Para exemplificar a morfologia dos agregados, Imagens de MHCE de filmes depositados a partir da agregação das cit-AuNP após a adição de eletrólito foram adquiridas. Tais imagens mostram a formação de um filme constituído de ilhas de agregados de AuNPs com propriedades ópticas heterogêneas, não sendo possível identificar diferenças claras entre os filmes feitos com diferentes sais. Na Figura 58 é exemplificado um filme preparado após a adição de $100\text{ }\mu\text{L}$ de NaCl 1 mol L^{-1} a uma suspensão de cit-AuNP.

Figura 58: Imagem óptica de MHCE (a), imagem hiperespectral de MHCE (b) e espectro de espalhamento para uma amostra de cit-AuNP agregada com NaCl.

5.4 Conclusões

Os resultados mostrados nesse capítulo mostram que as propriedades ópticas de nanopartículas de ouro estão diretamente ligadas à sua morfologia e consequentemente ao método de síntese das mesmas. Partículas menores que 20 nm apresentam baixa eficiência de espalhamento e seu espectro de extinção é dominado pela contribuição da absorção. Já para partículas maiores de 100 nm as propriedades ópticas são dominadas pela seção de choque de espalhamento.

Foi mostrado que mesmo partículas que apresentam tamanhos médios e distribuições de tamanhos muito próximos podem apresentar propriedades ópticas diferentes. Como é o caso da cit-AuNP e ceto-AuNP, que apresentam diferentes populações de partículas espalhando radiação de comprimento de onda verde e vermelho, por exemplo. Além de apresentarem diferentes tempos de vidas das oscilações plasmônicas, que podem estar correlacionados com o ambiente químico em que as partículas estão inseridas, que será discutido no Capítulo 6.

Adicionalmente foi mostrado que o acoplamento plasmônico das AuNPs em suspensão não depende apenas da força iônica do meio ou da carga da dupla camada. Mas apresenta um efeito

específico que depende da natureza das interações das moléculas constituintes da dupla camada com a superfície do ouro.

A caracterização das propriedades ópticas de nanopartículas de ouro é de suma importância para um estudo mais aprofundado das propriedades superficiais e dos processos que ocorrem na interface entre a partícula e o ambiente químico ao seu redor. Dessa forma os conceitos de ressonância plasmônica, tempo de vida dos plasmons e acoplamento plasmônico, apresentados aqui, juntamente com conceitos de química de coordenação clássica serão o ponto central para o estudo da química de coordenação de superfície de nanopartículas de ouro, discutidas nos capítulos seguintes.

6 Química de Coordenação de Superfície de Nanopartículas de Ouro: O quarto papel do citrato

6.1 Introdução

6.1.1 Química de Coordenação de AuNP e o Efeito SERS

Conforme discutido no Capítulo 2.3 a funcionalização de nanopartículas metálicas vem sendo amplamente utilizada com o intuito de tornar a aplicação de AuNPs mais específicas. Porém a caracterização da superfície e das propriedades da interface de tais partículas é algo extremamente complexo, envolvendo uma grande diversidade de técnicas experimentais, como por exemplo, XPS,¹⁴⁴ espectroscopia no Uv-Vis,⁵⁶ espectroscopia no infravermelho,¹⁴⁵ e espectroscopia de fluorescência.^{53,146} Além de trabalhos teóricos utilizando métodos de primeiros princípios como TD-DFT^{41,43,47,48,147} ou métodos híbridos utilizando um modelo de interação discreta para descrever as partículas e TD-DFT para modelar as moléculas.^{46,148,149} Dentre todas as técnicas, a mais utilizada para caracterização da estrutura de moléculas na superfície de nanoestruturas é a Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície, o efeito SERS.^{52,150–152}

O efeito SERS tornou a espectroscopia Raman, que era uma técnica espectroscópica de baixa sensibilidade, em um dos métodos de análise mais sensíveis, sendo o único capaz de atingir o limite de detecção de apenas uma molécula e dar a impressão digital química da molécula na superfície de nanopartículas simultaneamente. Por consequência, o efeito SERS tornou-se um dos assuntos mais pesquisados, principalmente em química analítica, para o desenvolvimento de sensores para uma variedade de espécies moleculares, desde biomoléculas^{153–159}, pesticidas^{160,161} a metais pesados.^{24,25,153} Apesar da intensa atividade de pesquisa no campo, existem muitos desafios e controvérsias a respeito do efeito das interações físico-químicas no efeito SERS. Particularmente, na questão da contribuição da agregação e das interações moleculares na superfície das partículas para os mecanismos de intensificação.

A intensificação do espalhamento Raman foi primeiramente observada por Fleischmann, Hendra e McQuillan¹⁶² em 1974, para moléculas de piridina adsorvidas em eletrodos rugosos na presença de cloreto, em dependência do potencial aplicado. Foi interpretada como um efeito da variação da concentração de piridina adsorvida no eletrodo pela variação do potencial aplicado.

Em 1977, Jeanmaire e Van Duyne,¹⁶³ atribuíram esse aumento de intensidade, para o mesmo sistema, ao campo elétrico gerado pela superfície metálica rugosa, uma vez que a intensidade da luz espalhada não podia ser correlacionada diretamente apenas com o grau de cobertura da superfície do eletrodo. No mesmo ano Albrecht e Creighton¹⁶⁴ também notaram uma discrepância entre o grau de cobertura da superfície e a intensidade do sinal Raman e propuseram a existência de estados eletrônicos novos ou alargados, causada pela interação da piridina com a superfície metálica, criando um efeito semelhante ao efeito Raman ressonante.

Atualmente o efeito SERS é observado em uma variedade de sistema, como por exemplo, em dispersões coloidais de nanopartículas metálicas isotrópicas^{25,165–171} e anisotrópicas^{160,172–177}, nanopartículas de óxidos metálicos^{178–183}, quantum dots¹⁸⁴ e em nanoestruturas metálicas organizadas.^{153,185,186}

Até o momento, a intensificação observada da luz espalhada tem como base dois mecanismos principais: o mecanismo eletromagnético (EM) e o mecanismo químico (CM).

O mecanismo EM, já é bem estabelecido, apresenta natureza clássica e surge devido aos plasmons de superfície, em ressonância com a radiação incidente, como discutido no Capítulo 5.1.1. É responsável por fatores de intensificação da ordem de 10^4 a 10^8 , sendo que a intensificação é maior em regiões de maior campo eletromagnético, como, por exemplo, em regiões de maior curvatura local ou em regiões entre partículas (*hot-spots*). Pode ser explicado através de métodos eletrodinâmicos clássicos, como a teoria Mie ou a aproximação de dipolos discretos (DDA).

Já o mecanismo CM está menos claro e ainda apresenta inúmeras controvérsias, tendo origem na sobreposição das funções de onda do metal e do adsorbato, apresenta três tipos de contribuições diferentes:

- Transferência de carga dinâmica (CT), na qual há uma condição de ressonância entre o laser incidente e transições do tipo de transferência de carga metal-ligante e ligante-metal;
- Raman Ressonante (RR), onde há a excitação de transições eletrônicas internas da molécula adsorvida;
- Mecanismo químico não ressonante (CHEM) que é causado devido a relaxação eletrônica na molécula, pela presença da estrutura metálica.

As três contribuições diferentes do mecanismo CM podem contribuir com um fator de intensificação da ordem de 10 a 10^6 . Os mecanismos EM e CM ocorrem mutuamente, de forma a produzir um efeito SERS global. A Figura 59 esquematiza os processos que ocorrem no efeito SERS.

Figura 59: Esquema ilustrando o mecanismo SERS, retirado da referência ¹⁸⁷

Nas seções seguintes serão discutidos com mais detalhes os fatores que influenciam a intensidade do espalhamento Raman convencional e cada um dos mecanismos do espalhamento Raman intensificado por superfície, descritos acima.

6.1.2 A teoria da Intensidade do Espalhamento Raman

O espalhamento Raman consiste no espalhamento inelástico de radiação monocromática incidente em uma molécula, mediado pelo momento de dipolo induzido na molécula, pelo campo eletromagnético da luz.^{188–190}

A interação da radiação de frequência ω_1 com uma molécula leva à aniquilação de um fóton com energia $(h/2\pi)\omega_1$. Como a energia desse fóton não corresponde a energia das transições eletrônicas da molécula, não há absorção de radiação e o papel do fóton é perturbar todos os estados eletrônicos da molécula, abrindo possibilidade de transições espectroscópicas, sem que ocorra absorção direta de radiação. Após a aniquilação do fóton incidente, há a geração de um fóton de energia $(h/2\pi)\omega_s$ e a molécula passa para um novo estado que pode apresentar energia igual ou diferente do estado inicial.

Se a molécula volta para um estado de mesma energia, a frequência da radiação espalhada será igual a frequência da radiação incidente ($\omega_s = \omega_1$), caracterizando um espalhamento elástico conhecido com espalhamento Rayleigh. Já se a molécula volta para um estado de energia diferente do inicial ocorre o chamado espalhamento Raman, que é dividido em espalhamento Raman Stokes ($\omega_s = \omega_1 - \omega_v$) e anti-Stokes ($\omega_s = \omega_1 + \omega_v$), onde ω_v está relacionado com as transições eletrônicas, vibracionais, rotacionais ou vibro-rotacionais da molécula.

O dipolo induzido (P) na molécula é correlacionado com o campo eletromagnético incidente (E) pelo tensor de polarizabilidade (α), Equação 33, que depende das coordenadas nucleares (Q) e da frequência vibracional da molécula (ω_v).

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

Classicamente, expandindo a polarizabilidade em uma série de Taylor e considerando que tanto as coordenadas nucleares e o campo elétrico da luz apresentam uma variação proporcional a $\cos(2\pi\omega t)$, pode-se mostrar que o espalhamento Rayleigh é proveniente de um dipolo induzido oscilante com frequência ω_1 e o espalhamento Raman é proveniente do dipolo induzido com frequências $\omega_1 \pm \omega_v$, Equação 34, ou seja o dipolo oscilante de frequência ω_1 é modulado por vibrações nucleares da molécula na frequência ω_v .

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\omega_1 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 Q_0 E_0 [\cos 2\pi t(\omega_1 - \omega_v) + \cos 2\pi t(\omega_1 + \omega_v)]$$

Equação 34

Da equação do momento de dipolo induzido, Equação 34, pode-se tirar as primeiras regras de seleção para o espalhamento de radiação por uma molécula. Para haver espalhamento Rayleigh, pelo menos um elemento do tensor de polarizabilidade intrínseca da molécula (α_0) deve ser diferente de zero, enquanto que para ocorrer espalhamento Raman, deve haver variação de pelo menos um componente do tensor de polarizabilidade com a variação das coordenadas nucleares, ou seja, $\partial\alpha/\partial Q$ deve ser diferente de zero.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰

Quanticamente, a intensidade da radiação espalhada é dependente do momento de transição de polarizabilidade, entre um estado inicial e final, definidos pelas suas respectivas funções de onda, que serão representadas simplificadaamente por $e^f v^f R^f$ e $e^i v^i R^i$, onde “e” é a parte eletrônica, “v” a vibracional e “R” a rotacional.

O campo elétrico da radiação incidente perturba os níveis energéticos da molécula, portanto o momento de transição de polarizabilidade pode ser calculado utilizando termos de perturbação, onde o campo aplicado é considerado no hamiltoniano do sistema perturbado. Esse termo de perturbação afeta a energia e as funções de ondas dos estados da molécula, fazendo com que um estado não seja mais definido apenas pelas propriedades de um único estado, e sim

apresente termos que envolvem o acoplamento entre diferentes estados, que são autofunções da equação de Schrödinger do sistema.

Com isso a expressão para a polarizabilidade dependerá da diferença de energia entre o estado inicial (estado fundamental, g) do sistema e um estado virtual qualquer (r), que devido a perturbação causada na molécula, apresenta contribuição de todos seus estados; do momento de transição de transições puramente eletrônicas (p_ρ , p_σ), envolvendo uma excitação do estado fundamental para o estado r, seguida de um decaimento do nível r para o estado final (f), Equação 35.¹⁸⁸

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{ef;ef} = \frac{1}{\hbar} \sum_{\substack{e^r v^r \neq e^g v^g \\ e^f v^f}} \left\{ \frac{\langle v^f | (p_\rho)_{ef} e^r | v^r \rangle \langle v^r | (p_\sigma)_{er} e^g | v^g \rangle}{\omega_{e^r e^g} + \omega_{v^r v^g} - \omega_1 - i\Gamma_{e^r v^r}} + \frac{\langle v^f | (p_\sigma)_{ef} e^r | v^r \rangle \langle v^r | (p_\rho)_{er} e^g | v^g \rangle}{\omega_{e^r e^f} + \omega_{v^r v^f} + \omega_1 + i\Gamma_{e^r v^r}} \right\}$$

Onde

$$(p_\rho)_{ef} e^r = \langle e^f | \hat{p}_\rho | e^r \rangle$$

Equação 35

A distribuição eletrônica de uma molécula depende da posição relativa dos núcleos dos átomos que a constituem e, conseqüentemente, depende das coordenadas normais de vibração, Q_k . Essa dependência pode ser expressa em uma série de Taylor do hamiltoniano eletrônico em função das coordenadas Q, Equação 36, onde o segundo e os termos de ordem maior constituem perturbações que podem acoplar diferentes estados eletrônicos.

$$\hat{H}_e(Q) = (\hat{H}_e)_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \hat{H}_e}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \hat{H}_e}{\partial Q_k \partial Q_l} \right) Q_k Q_l + \dots$$

Equação 36

Um estado perturbado do sistema e^r apresenta estados não perturbados, e^r e e^s , misturados pelo hamiltoniano eletrônico, perturbado pelas vibrações nucleares. Quando o

deslocamento dos átomos no modo normal Q_k é pequeno, em relação à distância de equilíbrio da ligação entre os átomos, a perturbação é adequadamente expressa truncando a série de Taylor no segundo termo. Aplicando esse hamiltoniano nos componentes de momento de transição de dipolo (p_ρ) da expressão da polarizabilidade, dada pela Equação 35, temos:

$$\begin{aligned}(p_\sigma)_{e^r e^g} &= (p_\sigma)_{e^r e^g}^0 + \frac{1}{\hbar} \sum_{e^s \neq e^r} \sum_k \frac{h_{e^r e^s}^k}{\omega_{e^r} - \omega_{e^s}} Q_k (p_\sigma)_{e^s e^g}^0 \\ &+ \frac{1}{\hbar} \sum_{e^t \neq e^g} \sum_k (p_\sigma)_{e^r e^t}^0 \frac{h_{e^t e^g}^k}{\omega_{e^g} - \omega_{e^t}} Q_k \\ (p_\rho)_{e^f e^r} &= (p_\rho)_{e^f e^r}^0 + \frac{1}{\hbar} \sum_{e^s \neq e^r} \sum_k (p_\rho)_{e^f e^s}^0 \frac{h_{e^s e^r}^k}{\omega_{e^r} - \omega_{e^s}} Q_k \\ &+ \frac{1}{\hbar} \sum_{e^t \neq e^f} \sum_k \frac{h_{e^f e^t}^k}{\omega_{e^f} - \omega_{e^t}} Q_k (p_\rho)_{e^t e^r}^0\end{aligned}$$

Equação 37

Onde $h_{e^s e^r}^k$ é a integral de acoplamento entre os estados e^s e e^r , e é dada pela Equação 38. O sobrescrito “0” indica os momentos de transição de dipolo dos estados não perturbados e os termos ω_e indicam as diferenças de energia entre os estados considerados.

$$h_{e^s e^r}^k = \langle \psi_{e^s}(Q_0) | (\partial \hat{H}_e / \partial Q_k)_0 | \psi_{e^r}(Q_0) \rangle$$

Equação 38

Quando há uma perturbação do hamiltoniano do sistema, o momento de dipolo de transição entre dois estados perturbados não envolve somente transições diretas entre esses estados, mas também apresenta contribuições adicionais de momentos de transições de dipolo envolvendo outros estados não perturbados acoplados. O processo de adquirir contribuições extras para os dipolos de transição é conhecido como acoplamento Herzberg-Teller e a extensão desse acoplamento é proporcional a integral de acoplamento entre os estados ($h_{e^s e^r}^k$), ao modo

normal de vibração Q_k e inversamente proporcional a diferença de energia entre os estados acoplados.¹⁸⁸

Chega-se em uma expressão geral para o momento de transição de polarizabilidade, Equação 39, introduzindo os momentos de transição de dipolo do sistema perturbado no momento de transição de polarizabilidade e utilizando a aproximação de Born-Oppenheimer. Considera-se que o momento de transição eletrônica e a integral de acoplamento não irão operar na parte vibracional das funções de onda e a parte rotacional da função pode ser desprezada.¹⁹¹

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{ef\ v^r:e^s\ v^j}^{\text{II}} = A^{\text{II}} + B^{\text{II}} + C^{\text{II}} + D^{\text{II}}$$

Onde

$$A^{\text{II}} = \frac{1}{\hbar} \sum_{\substack{e^r\ v^r \neq e^s\ v^j \\ e^f\ v^f}} \left\{ \frac{(p_\rho)_{ef\ e^r}^0 (p_\sigma)_{e^r\ e^s}^0}{\omega_{e^r\ v^r:e^s\ v^j} - \omega_1 - i\Gamma_{e^r\ v^r}} + \frac{(p_\sigma)_{ef\ e^r}^0 (p_\rho)_{e^r\ e^s}^0}{\omega_{e^r\ v^r:e^f\ v^f} + \omega_1 + i\Gamma_{e^r\ v^r}} \right\} \langle v^f | v^r \rangle \langle v^r | v^j \rangle$$

$$B^{\text{II}} = \frac{1}{\hbar^2} \sum_{\substack{e^r\ v^r \neq e^s\ v^j \\ e^f\ v^f}} \sum_{e^s \neq e^r} \sum_k \left\{ \frac{(p_\rho)_{ef\ e^s}^0 h_{e^s\ e^r}^k (p_\sigma)_{e^r\ e^s}^0}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^s})(\omega_{e^r\ v^r:e^s\ v^j} - \omega_1 - i\Gamma_{e^r\ v^r})} \right. \\ \left. + \frac{(p_\sigma)_{ef\ e^s}^0 h_{e^s\ e^r}^k (p_\rho)_{e^r\ e^s}^0}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^s})(\omega_{e^r\ v^r:e^f\ v^f} + \omega_1 + i\Gamma_{e^r\ v^r})} \right\} \langle v^f | Q_k | v^r \rangle \langle v^r | v^j \rangle \\ + \frac{1}{\hbar^2} \sum_{\substack{e^r\ v^r \neq e^s\ v^j \\ e^f\ v^f}} \sum_{e^s \neq e^r} \sum_k \left\{ \frac{(p_\rho)_{ef\ e^r}^0 h_{e^r\ e^s}^k (p_\sigma)_{e^s\ e^s}^0}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^s})(\omega_{e^r\ v^r:e^s\ v^j} - \omega_1 - i\Gamma_{e^r\ v^r})} \right. \\ \left. + \frac{(p_\sigma)_{ef\ e^r}^0 h_{e^r\ e^s}^k (p_\rho)_{e^s\ e^s}^0}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^s})(\omega_{e^r\ v^r:e^f\ v^f} + \omega_1 + i\Gamma_{e^r\ v^r})} \right\} \langle v^f | v^r \rangle \langle v^r | Q_k | v^j \rangle$$

$$C^{\text{II}} = \frac{1}{\hbar^2} \sum_{\substack{e^r\ v^r \neq e^s\ v^j \\ e^f\ v^f}} \sum_{e^t \neq e^f\ e^s} \sum_k \left\{ \frac{h_{ef\ e^t}^k (p_\rho)_{e^t\ e^r}^0 (p_\sigma)_{e^r\ e^s}^0}{(\omega_{ef} - \omega_{e^t})(\omega_{e^r\ v^r:e^s\ v^j} - \omega_1 - i\Gamma_{e^r\ v^r})} \right.$$

$$\begin{aligned}
& + \frac{h_{efe^t}^k (p_\sigma)_{e^t e^r}^0 (p_\rho)_{e^r e^g}^0}{(\omega_{ef} - \omega_{e^t})(\omega_{e^r v^r; ef v^f} + \omega_1 + i\Gamma_{e^r v^r})} \left\{ \langle v^f | Q_k | v^r \rangle \langle v^r | v^i \rangle \right. \\
& + \frac{1}{\hbar^2} \sum_{\substack{e^r v^r \neq e^g v^i, \\ e^f v^f}} \sum_{e^t \neq e^f e^g} \sum_k \left\{ \frac{(p_\rho)_{ef e^r}^0 (p_\sigma)_{e^r e^t}^0 h_{e^t e^g}^k}{(\omega_{e^g} - \omega_{e^t})(\omega_{e^r v^r; e^g v^i} - \omega_1 - i\Gamma_{e^r v^r})} \right. \\
& + \left. \frac{(p_\sigma)_{ef e^r}^0 (p_\rho)_{e^r e^t}^0 h_{e^t e^g}^k}{(\omega_{e^g} - \omega_{e^t})(\omega_{e^r v^r; ef v^f} + \omega_1 + i\Gamma_{e^r v^r})} \right\} \langle v^f | v^r \rangle \langle v^r | Q_k | v^i \rangle \\
D^{II} = & \frac{1}{\hbar^3} \sum_{\substack{e^r v^r \neq e^g v^i, \\ e^f v^f}} \sum_{e^s, e^{s'} \neq e^r} \sum_{k, k'} \left\{ \frac{(p_\rho)_{ef e^s}^0 h_{e^s e^r}^k h_{e^r e^{s'}}^{k'} (p_\sigma)_{e^{s'} e^g}^0 \langle v^f | Q_k | v^r \rangle \langle v^r | Q_{k'} | v^i \rangle}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^s})(\omega_{e^r} - \omega_{e^{s'}})(\omega_{e^r v^r; e^g v^i} - \omega_1 - i\Gamma_{e^r v^r})} \right. \\
& + \left. \frac{(p_\sigma)_{ef e^{s'}}^0 h_{e^{s'} e^r}^{k'} h_{e^r e^s}^k (p_\rho)_{e^s e^g}^0 \langle v^f | Q_{k'} | v^r \rangle \langle v^r | Q_k | v^i \rangle}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^{s'}})(\omega_{e^r} - \omega_{e^s})(\omega_{e^r v^r; ef v^f} + \omega_1 + i\Gamma_{e^r v^r})} \right\}
\end{aligned}$$

Equação 39

Essa expressão é válida para processos de espalhamento envolvendo transições, eletrônicas, vibrônicas e puramente vibracionais em condição de ressonância com a radiação incidente ou fora dela. As considerações específicas de cada caso não serão discutidas aqui, porém podem-se tirar conclusões gerais. A Equação 39 ilustra as transições de dipolo elétrico e os acoplamentos entre estados envolvidos no acoplamento Herzberg-Teller e equacionados nos termos A^{II}, B^{II} e C^{II}.

O termo A^{II} descreve basicamente o espalhamento Rayleigh, pois a condição para o termo $\langle v^f | v^r \rangle \langle v^r | v^i \rangle$ ser diferente de zero é que os estados vibracionais finais e iniciais sejam iguais ($v^f = v^i$), ou seja não haverá variação da frequência da radiação espalhada em relação a incidente. Além disso, o termo $[(p_\sigma)_{ef e^g}^0 (p_\rho)_{e^f e^r}^0]$ descreve o mecanismo de Frank-Condon, presente quando não há acoplamento entre os estados eletrônicos, Figura 60a.

Figura 60: Momentos de transição de dipolo e termos de acoplamento Herzberg-Teller que ocorrem nos termos da Equação 39.¹⁸⁸

Os termos B^{II} e C^{II} representam o espalhamento Raman relacionados aos modos fundamentais ($v^f = v^i \pm 1$). Como a integral de acoplamento é inversamente proporcional a diferença de energia entre os estados, o termo que apresentará maior contribuição será o termo B^{II} , uma vez que a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado é muito maior que a diferença de energia entre os estados excitados. Nele os todos termos do numerador devem ser diferentes de zero para que um modo vibracional seja observado. Portanto temos:

- A integral $\langle v^f | Q_k | v^r \rangle \langle v^i |$ será diferente de zero se $v^f = v^i \pm 1$;
- Para que ocorra acoplamento entre os estados e^s , e^r e o termo $h^k_{e^r e^s}$ seja diferente de zero os estados e^s e e^r devem ser acessíveis aos estados e^f e e^g por transições de dipolo permitidas;

- A condição de simetria $\Gamma(e^r) \times \Gamma(Q_k) \times \Gamma(e^s) = \Gamma_1$, onde Γ é a representação de simetria, deve ser satisfeita para que o termo $h_{e^r e^s}^k$ seja diferente de zero. Uma vez que o termo $\partial H / \partial Q_k$ da integral de acoplamento apresenta a mesma representação de simetria do modo Q_k , este deve conter espécies da multiplicação direta $\Gamma(e^r) \times \Gamma(e^s)$. Como a representação de simetria dos termos e^r e e^s devem conter um componente do momento de dipolo da molécula para serem acessíveis por transições de dipolo permitidas, o termo $\Gamma(Q_k)$ deve conter espécies da multiplicação direta da representação de simetria das coordenadas de translação da molécula ($x^2, xy, xz, y^2, yz, z^2$).

O termo D^{ll} envolve uma somatória da variação de dois modos normais, Q_k e $Q_{k'}$, quando $k = k'$ têm-se os modos harmônicos, enquanto que quando $k \neq k'$ têm-se os modos de combinação. A análise desses modos envolve a consideração de um oscilador anarmônico e não será considerada aqui.

Quando $\omega_{efvgvi} = \omega_1$, ou seja a radiação incidente estiver em ressonância com uma transição eletrônica da molécula os termos $1/(\omega_{efvgvi} - \omega_1)$ atingem seu valor máximo, ocasionando um aumento da intensidade do modo Q_k observado. Adicionalmente quando uma transição eletrônica está envolvida, o estado e^r deixa de ser um estado virtual do sistema e passa a ser um estado real, aumentando a sua contribuição para os termos de acoplamento e para os momentos de dipolo das transições eletrônicas. Esse efeito é conhecido como Raman Ressonante.

A conclusão que pode ser tirada é que a intensidade Raman tem sua origem na intensificação de transições eletrônicas permitidas, devido ao acoplamento entre diferentes estados eletrônicos, mediados pelo modo normal de vibração e a observação de um determinado modo deve respeitar as condições de simetria. A discussão profunda do efeito Raman é necessária para entender como as perturbações causadas na molécula, devido a interação com uma superfície, afetam o espalhamento de radiação e as propriedades da molécula.

6.1.3 A Teoria Unificada do Efeito SERS

O efeito SERS atualmente é explicado com base em três mecanismos, o mecanismo eletromagnético (EM), químico ressonante (CM, e o mecanismo Raman ressonante (RR) intrínseco do ligante. Recentemente, um quarto fator de intensificação vem sendo considerado, principalmente em estudos teóricos, o efeito químico não ressonante (CHEM), que surge devido às interações dos estados fundamentais do ligante e da partícula.

O formalismo teórico por trás do mecanismo EM foi discutido detalhadamente no Capítulo 5.1.1 e não será abordado nesse capítulo. A discussão será focada nos efeitos químicos ressonantes e não ressonantes.

6.1.3.1 Efeito Químico Ressonante

O tratamento mais aceito atualmente para o efeito químico, foi proposto inicialmente por Lombardi e Birke^{192–194} e consiste em uma expansão do formalismo de Albrecht¹⁹¹ para a intensidade do espalhamento Raman normal, em função da perturbação causada pela variação das coordenadas nucleares, discutido no Capítulo 6.1.2.

Como foi mostrado anteriormente a intensidade do espalhamento Raman tem sua origem em um “roubo” de intensidade de transições eletrônicas permitidas, entre estados eletrônicos da molécula que são acoplados por um modo normal Q_k . Para o caso convencional, considera-se que o acoplamento só ocorre entre os estados excitados do sistema (e^r , e^s e e^t) pois a diferença de energia entre os estados excitados e fundamental é muito maior que a diferença de energia entre

os estados excitados, fazendo com que a contribuição do termo $h_{ef_{et}}^k$ e $h_{et_{eg}}^k$ seja pequena. Dessa forma o termo C^{II} da Equação 39 é desconsiderado.

Porém quando considera-se o sistema ligante-nanopartícula como um todo, essa aproximação não é mais válida. Devido à grande densidade de estados da partícula metálica haverá estados das bandas de condução e valência próximos ao nível de Fermi com energia adequada para que o acoplamento entre os estados excitados e fundamental do sistema ligante-partícula sejam observados.

Dessa forma pode-se considerar que os estados e^s ou e^t representam os estados do metal próximos ao nível de Fermi (e^M), reescrevendo a Equação 39, considerando apenas os modos fundamentais e que a excitação é feita fora de qualquer região de absorção molecular, obtém-se a equação de momento de transição de polarizabilidade que contabiliza transições de transferência de carga do tipo ligante-partícula e partícula-ligante, Equação 40.

Novamente, o termo A^{III} representa o espalhamento Rayleigh, no qual $v^i=v^f$. Já os termos B^{III} e C^{III} representam o espalhamento Raman envolvendo transições ligante-partícula e partícula-ligante, respectivamente, Figura 60. Quando não há interação química entre o ligante e a partícula os termos $(p_\rho)_{ef_{e^M}}^0$ e $(p_\sigma)_{e^M_{eg}}^0$ são iguais a zero, não ocorrendo transições de transferência de carga. Porém quando há formação de uma ligação química, mesmo que fraca, esses termos passam a apresentar contribuição significativa e adicionalmente os termos $h_{e^M_{eg}}^k$ e $h_{ef_{e^M}}^k$ também apresentam contribuições diferentes de zero. Os processos envolvidos estão esquematizados na Figura 61.

$$\begin{aligned}
(\alpha_{\rho\sigma})_{efvf;egvi}^{III} &= A^{III} + B^{III} + C^{III} \\
A^{III} &= \frac{1}{\hbar} \sum_{e^r \neq eg, ef} \left\{ \frac{(p_\rho)^0_{ef e^r} (p_\sigma)^0_{e^M eg}}{(\omega_{e^r eg} - \omega_1)} + \frac{(p_\sigma)^0_{ef e^r} (p_\rho)^0_{e^r eg}}{(\omega_{e^r eg} + \omega_1)} \right\} \langle v^f | v^i \rangle \\
B^{III} &= \frac{1}{\hbar^2} \sum_{e^r \neq eg, ef} \sum_{e^M \neq e^r} \sum_k \left\{ \frac{(p_\rho)^0_{ef e^M} h_{e^M e^r}^k (p_\sigma)^0_{e^r eg}}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^M})(\omega_{e^r eg} - \omega_1)} + \frac{(p_\sigma)^0_{ef e^M} h_{e^M e^r}^k (p_\rho)^0_{e^r eg}}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^M})(\omega_{e^r eg} + \omega_1)} \right\} \langle v^f | Q_k | v^i \rangle \\
&\quad + \frac{1}{\hbar^2} \sum_{e^r \neq eg, ef} \sum_{e^M \neq e^r} \sum_k \left\{ \frac{(p_\rho)^0_{ef e^r} h_{e^r e^M}^k (p_\sigma)^0_{e^M eg}}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^M})(\omega_{e^r eg} - \omega_1)} \right. \\
&\quad \left. + \frac{(p_\rho)^0_{ef e^r} h_{e^r e^M}^k (p_\sigma)^0_{e^M eg}}{(\omega_{e^r} - \omega_{e^M})(\omega_{e^r eg} + \omega_1)} \right\} \langle v^f | Q_k | v^i \rangle \\
C^{III} &= \frac{1}{\hbar^2} \sum_{e^r \neq eg, ef} \sum_{e^M \neq ef, eg} \sum_k \left\{ \frac{h_{ef e^M}^k (p_\rho)^0_{e^M e^r} (p_\sigma)^0_{e^r eg}}{(\omega_{ef} - \omega_{e^M})(\omega_{e^r eg} - \omega_1)} + \frac{h_{ef e^M}^k (p_\rho)^0_{e^M e^r} (p_\sigma)^0_{e^r eg}}{(\omega_{ef} - \omega_{e^M})(\omega_{e^r eg} + \omega_1)} \right\} \langle v^f | Q_k | v^i \rangle \\
&\quad + \frac{1}{\hbar^2} \sum_{e^r \neq eg, ef} \sum_{e^M \neq e^r} \sum_k \left\{ \frac{(p_\rho)^0_{ef e^r} (p_\sigma)^0_{e^r e^M} h_{e^M eg}^k}{(\omega_{eg} - \omega_{e^M})(\omega_{e^r eg} - \omega_1)} \right. \\
&\quad \left. + \frac{(p_\rho)^0_{ef e^r} (p_\sigma)^0_{e^r e^M} h_{e^M eg}^k}{(\omega_{eg} - \omega_{e^M})(\omega_{e^r eg} + \omega_1)} \right\} \langle v^f | Q_k | v^i \rangle
\end{aligned}$$

Equação 40

Figura 61: Esquema das contribuições envolvidas no momento de transição de polarizabilidade considerando transições de transferência de carga partícula ligante, que surge com o acoplamento de Herzberg-Teller dos estados e^g , e^f , e^r e e^M .

As condições para os termos B^{III} e C^{III} não serem iguais a zero são semelhantes as discutidas no caso do efeito Raman normal, porém nesse caso deve-se considerar a representação de simetria dos estados do metal, e^M , na multiplicação direta das representações de simetria. Contudo, as representações de simetria devem ser encontradas em relação ao grupo de ponto do novo sistema ligante-partícula, que deve ser mais baixo que o grupo de ponto do ligante e da partícula livres. Porém, a menos que considere-se que a superfície da partícula seja perfeitamente homogênea, ou que os sítios de coordenações livres tenham uma simetria bem definida e que o ligante apresente um eixo de simetria normal à superfície não haverá elementos de simetria, para o sistema como um todo. Dessa forma, todas as representações irredutíveis serão totalmente simétricas, implicando que todos os modos que possam acoplar diferentes estados eletrônicos sejam permitidos.

O estudo do mecanismo químico em nanopartículas plasmônica é uma tarefa complicada que envolve uma análise minuciosa dos espectros SERS. Porém de maneira simplificada, pode-se inferir a sua existência através da análise do acoplamento Herzberg-Teller, no qual a intensificação de modos normais não simétricos é maior em relação aos modos simétricos. Alternativamente, a existência de estados de transferência de carga têm sido comprovada por cálculos teóricos de primeiros princípios utilizando DFT/TD-DFT.

Esses estudos correlacionam as propriedades de sistemas pequenos, envolvendo clusters de normalmente até 20 átomos e uma molécula de ligante, com as propriedades dos complexos formados na superfície das partículas, através da comparação entre os perfis e intensidade do espectro SERS calculado e experimental. A maioria dos trabalhos são focados em sistemas envolvendo clusters de ouro ou prata e derivados de piridina como ligantes, nesses sistemas a

interação entre o ligante e a superfície não é forte o suficiente para que ocorram processos de reorganização da estrutura do cluster, facilitando a interpretação.

Os fatores de intensificação teóricos calculados para o mecanismo CT variam na faixa de 10^3 a 10^6 , devido a existência de transições de transferência de carga. Jensen et al. utilizando clusters com 20 átomos de prata, mostraram que a coordenação da piridina, apresenta forças de ligações diferentes quando ocorre nas faces ou nas pontas do cluster, sendo que na última a força de ligação é maior.¹⁹⁵ Além disso, há um desdobramento dos estados eletrônicos da piridina, devido à quebra de simetria causada pela interação com os orbitais do cluster. Porém, nesse caso o desdobramento é maior quando a coordenação ocorre nas faces. Dessa forma, há o surgimento de transições de transferência de carga entre o HOMO, centrado no cluster e os orbitais LUMO e LUMO+1, que apresentam contribuições predominantemente da piridina.

Estendendo o estudo para um cluster de ouro com 20 átomos, os mesmos autores mostraram que a intensificação do espalhamento Raman proveniente do efeito EM é menor no ouro, em relação a prata. Contudo, analisando as contribuições do mecanismo CM chegam a conclusão que no complexo formado entre a piridina e o cluster de ouro, a força do oscilador para transições de transferência de carga metal-ligante são maiores em relação ao complexo com prata.¹⁹⁶

Hongxing et al. introduziram a utilização de um método baseado na diferença de densidade de cargas entre os estados excitado e fundamental, para a visualização dos estados de transferência de cargas. Com esse método, mostraram que considerando um complexo piridina- Ag_{20} , quando a excitação é feita acima de 725 nm não há ressonância com nenhuma transição eletrônica e a intensificação do espectro Raman ocorre devido ao aumento de polarizabilidade causado pela interação metal-ligante. Quando a excitação é feita entre 725 a 503 nm e as transições internas do cluster são excitadas, a intensificação ocorre devido a transferência de energia do clusters para a piridina através do mecanismo de Foster, sendo análogo ao mecanismo

EM observado em nanopartículas. Já para excitações feitas entre 80-500 nm, as transições entre os estados próximos ao nível de Fermi e o LUMO da piridina são excitadas e a intensificação do espectro Ramam ocorre pelo mecanismo CT.⁵⁰

6.1.3.2 Efeito Químico Não Ressonante (CHEM)

O efeito químico não ressonante vem sendo estudado teoricamente por métodos de primeiros princípios, como DFT/TD-DFT,^{41-43,47,48,197,198} porém as evidências experimentais ainda não levam a conclusão sobre seu efeito real.

É um mecanismo estático que surge a partir da sobreposição das funções de onda dos estados fundamentais do ligante e da nanopartículas. Tais interações levam a uma relaxação dos estados eletrônicos do ligante devido a interação com a superfície metálica, aumentando a polarizabilidade do sistema. Dessa forma, esse efeito está correlacionado com as características do complexo formado na superfície, sendo sensível à geometria do ligante na superfície da partícula; a simetria do complexo ligante-partícula e o ambiente químico ao redor da molécula. De uma maneira simplificada, ligantes que apresentam maior força de interação com a superfície da partícula, maior deslocalização eletrônica e possibilidade de retrodoação, podem levar a uma contribuição elevada do mecanismo CHEM para o efeito SERS.⁴⁷

Nesse mecanismo, o fator de intensificação pode ser estimado como sendo a razão entre a menor energia de excitação da molécula livre e a menor energia de transferência de carga, Equação 41. Simplificadamente, para sistemas com alta sobreposição das funções de onda, o fator de intensificação será proporcional a razão entre a diferença de energia HOMO-LUMO do ligante livre e do complexo ligante-cluster. Na Equação 41 ω_x é a diferença de energia HOMO-LUMO na molécula isolada e ω_{x-Au} é a energia do primeiro estado excitado do complexo. Os valores

calculados para diferentes sistemas variam na faixa de 5 a 1000, dependendo do funcional, do conjunto de bases e das aproximações para os potenciais da camada interna utilizados no cálculo. Sendo que os valores mais aceitos estão na faixa de 5 a 100.⁴⁷

$$EF_{int}^{CHEM} = \left(\frac{\omega_e^X}{\omega_{e^{X-Au}}^X} \right)^4 \approx \left(\frac{\omega_X}{\omega_{X-Au}} \right)^4$$

Equação 41

6.1.3.3 Unificando o efeito SERS

Considerando o efeito Raman Ressonante, a Ressonância Plasmônica de Superfície e as transições de transferência de carga partícula-ligante, discutidas anteriormente, uma visão unificada introduzida por Lombardi e Birke¹⁹⁹, em extensão ao formalismo de Albrecht¹⁹¹, para o efeito SERS pode ser equacionada. Nesse caso o momento de transição de polarizabilidade é descrito pela Equação 42, onde os termos do denominador consideram a contribuição de cada mecanismo. O mecanismo EM é considerado no primeiro termo, que inclui as funções dielétricas da nanopartícula metálica [$\epsilon_1(\omega)$ e ϵ_2], do ambiente ao redor da partícula (ϵ_m), e atinge seu valor mínimo na ressonância plasmônica, maximizando o efeito para o $\alpha_{eg_e^F}$. Esse termo surge da equação da seção de choque de extinção calculada por Mie, que racionaliza os processos de espalhamento e absorção de radiação para uma partícula esférica isolada, discutidos no Capítulo 5. Além disso o campo elétrico oscilante de uma nanopartícula isolada é proporcional a r^{-3} , onde r é a distância de um ponto em relação à superfície da partícula, estando essencialmente confinado na superfície. Portanto, pelo efeito EM apenas os modos vibracionais das moléculas próximas à superfície serão intensificados.^{13,200}

O segundo termo envolve as interações de transferência de carga entre os estados eletrônicos do metal, representado pelo nível Fermi da partícula (e^F) e os estados eletrônicos

excitados (e^r) da molécula ligada à superfície, e condição de ressonância ocorre quando a frequência da radiação incidente (ω_1) é igual a diferença de energia entre os estados eletrônicos acoplados do ligante e da partícula metálica ($\omega_{e^F e^r}$), Figura 61. O terceiro termo considera o efeito RR na molécula adsorvida e sua contribuição é máxima quando o laser de excitação está em ressonância com uma transição eletrônica totalmente permitida, envolvendo o estado fundamental (e^g) e o estado excitado (e^r). Os Γ estão relacionados com os processos de amortecimento das vibrações moleculares, contribuindo diretamente para a forma da banda observada. Por se tratar de um produto de funções, os três termos devem ser diferentes de zero para que o efeito de intensificação seja observado, e devido a magnitude do efeito eletromagnético, este acaba intensificando os demais.

$$\alpha_{e^g e^F}(\omega) = \frac{p_{e^r e^g} p_{e^F e^r} h_{e^g e^F}^k \langle v^f | Q_k | v^i \rangle}{[(\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_2^2][\omega_{e^F e^r}^2 - \omega_1^2 - \Gamma_{e^F e^r}^2][\omega_{e^g e^r}^2 - \omega_1^2 - \Gamma_{e^g e^r}^2]}$$

Equação 42

O numerador é o produto dos momentos de transição da molécula adsorvida ($p_{e^r e^g}$), da transferência de carga nanopartícula-molécula ($p_{e^F e^r}$), o termo de Herzberg-Teller, $h_{e^g e^F}^k$, e a integral do modo normal de vibração, $\langle v^f | Q_k | v^i \rangle$, definindo as regras de seleção, discutidas nas seções anteriores.

Os quatro termos devem ser diferentes de zero para ocorra a intensificação de um determinado modo normal através do efeito SERS. Essa equação apresenta uma utilidade enorme por explicar com certa precisão os resultados observados experimentalmente, porém ainda existem pontos abertos para discussão. Por exemplo, para sistemas mais complexos envolvendo estruturas anisotrópicas ou condições de acoplamento interpartículas, uma expansão do termo referente ao efeito EM deveria ser considerada. Além disso, efeitos recentemente descobertos, com o efeito CHEM ainda não apresentam uma forma unificada para que possam ser considerados na equação.

Neste capítulo será abordada a caracterização da superfície das partículas de ouro dando um enfoque de química de coordenação de superfície. Para isso, serão utilizados os resultados referentes as propriedades ópticas das partículas, com base em dados de espectroscopia eletrônica e Microscopia Hiperespectral de Campo Escuro (MHCE), discutidos no Capítulo 5. Em seguida, a caracterização da superfície das AuNPs será feita por Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície, modelagens moleculares realizadas por TD-DFT, conforme discutido no Capítulo 3.1.8, e espectrometria de massas. Os resultados mostram a possibilidade de controlar as propriedades superficiais das partículas a partir do controle das condições experimentais e que a extensão de conceitos clássicos de química de coordenação é de suma importância para o entendimento das interações químicas na interface nanopartículas-molécula.

6.2 Parte Experimental

Para a caracterização das propriedades superficiais serão utilizadas as partículas cit-AuNP e ceto-AuNP, sintetizadas de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 4.2.

Com o intuito de avaliar quais espécies estão adsorvidas na superfície das nanopartículas, por espectrometria de massas, 2 mL de solução de AuNP foram misturadas com 0.5 mL de solução de 4-mercaptopiridina (4-Mpy) à temperatura ambiente. Como a 4-Mpy não possui carga ao se ligar à superfície do ouro a estabilidade do coloide é perdida e as partículas tendem a agregar. Por isso, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante foi separado e analisado por espectrometria de massas.

A caracterização por Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície foi realizada utilizando a solução concentrada de AuNP com e sem NaCl (3 mmol L^{-1}). Os espectros SERS foram adquiridos com comprimentos de onda de excitação de 532, 633 e 785 nm. Para fins comparativos

todos espectros foram medidos utilizando potências de 50 mW e tempo de integração de 120 segundos.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Caracterização da Superfície das AuNPs

Como discutido nos capítulos anteriores, o citrato apresenta três papéis fundamentais na síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich: agente redutor, estabilizante e regulador do pH. Neste capítulo será discutido como a variação da concentração de citrato pode controlar as propriedades químicas das superfícies das nanopartículas, revelando uma quarta função ainda não atribuída ao íon citrato.

Para simplificar as discussões foram comparadas as partículas ceto-AuNP e cit-AuNP, cujos parâmetros de síntese estão apresentados na Tabela 2 do Capítulo 4.2. Por apresentarem distribuições de tamanho próximas, a contribuição do efeito eletromagnético em ambas pode ser considerada igual. Portanto as diferenças existentes serão causadas principalmente pelas mudanças nas interações entre o ligante e superfície das partículas.

As espécies adsorvidas nas partículas foram caracterizadas inicialmente por espectrometria de massas. Para isso, elas foram removidas da superfície das AuNPs através da adição de 4-mercaptopiridina, conforme descrito no Capítulo 6.2. Ligantes que apresentam grupo tiol possuem maior afinidade por ouro em relação aos que apresentam apenas grupos carboxilatos, sendo capazes de substituir essas espécies quando estão adsorvidas na superfície das AuNP. Como a 4-Mpy não possui carga ao se ligar à superfície do ouro a estabilidade do coloide é perdida e as partículas tendem a agregar.

Nesse experimento de troca, o espectro de massas típico do sobrenadante, é mostrado na Figura 62.

Figura 62: Espectro de Massas do sobrenadante de uma suspensão de (A) ceto-AuNP e (B) cit-AuNP, após tratamento com 4-Mpy ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em (C) é mostrado o espectro de fragmentação do pico com razão massa/carga de 190.9.

Para a síntese feita com proporção de citrato:Au de 3:2 (ceto-AuNP), além do pico referente ao citrato com razão massa/carga de 190.9, observa-se um pico com relação massa/carga de 144.9, o qual pode ser inequivocamente atribuído à acetonadicarboxilato, ACDC, Figura 62A. Já para síntese utilizando um excesso de citrato (cit-AuNP) não há evidência da ACDC no espectro de massas, Figura 62B. O pico em 111.1 pode ser atribuído a um fragmento do citrato, como é mostrado no espectro MS/MS, Figura 62C, ou ao excesso de 4-Mpy. Portanto, espera-se que na cit-AuNP apenas o citrato esteja adsorvido na superfície, enquanto que para as ceto-AuNPs espera-se encontrar uma mistura de citrato e ACDC.

A ACDC desempenha um papel importante nas etapas de formação das partículas, como foi discutido no Capítulo 4, porém sua presença na superfície das AuNPs é fato inédito e surpreendente, devido à sua instabilidade nas temperaturas de síntese. Portanto, sua detecção

revela a existência de um efeito estabilizante provocado pela sua ligação às das nanopartículas de ouro.

A adição mais rápida de citrato na síntese das cet-AuNPs acelera a uma etapa de redução e nucleação, conforme discutido no Capítulo 4.3.3. Assim, a formação mais rápida das partículas poderia prover o suporte necessário para que a ACDC gerada in-situ se coordene à superfície do ouro, levando simultaneamente à estabilização das AuNPs e da ACDC ancorada na superfície das mesmas. Já na síntese das cit-AuNPs, a adição mais lenta retarda a etapa de nucleação, de forma que a ACDC gerada não consegue competir com o excesso de citrato existente, sofrendo decomposição térmica antes de coordenar-se aos núcleos formados.

Nesse ponto, vale a pena lembrar que o SERS tem sido a estratégia mais empregada na caracterização da superfície de nanopartículas plasmônicas. Acreditamos que um melhor entendimento de como as propriedades moleculares podem aumentar os fatores de intensificação do efeito SERS seja de grande relevância, para compreender as diferenças entre a cit-AuNP e cet-AuNP

Surpreendentemente, as cet-AuNPs apresentaram sinais Raman bastante intensos, mesmo em condição em que não se observa agregação, a julgar pelos espectros de extinção apresentados no Capítulo 5.3.1. O perfil de excitação do espectro SERS das cet-AuNPs, em solução e em condição na qual não é observada agregação, foi medido utilizando comprimentos de onda de 532, 633 e 785 nm, Figura 63. É importante destacar que nenhum sinal SERS foi detectado para as cit-AuNPs sob condições similares, independente do comprimento de onda de excitação utilizado. A dependência da intensificação SERS com os comprimentos de onda é bastante curiosa, principalmente em 532 nm, onde se daria a ressonância com a banda plasmônica das nanopartículas.

A atribuição tentativa para os modos da ACDC na superfície das cet-AuNP, feita com base nos cálculos teóricos, é mostrada na Tabela 10.

Figura 63: Espectro SERS da cito-AuNP não agregadas utilizando diferentes comprimentos de onda de excitação. A) 785 nm; B) 633 nm; C) 532 nm.

De forma geral, para nanopartículas esféricas o efeito SERS tem sido associado a dois efeitos: a excitação dos plasmon de superfície, gerando campos eletromagnéticos intensificados, localizados na superfície das partículas e; e com a influência dos *hot-spots*, localizados em regiões de confluência dos campos eletromagnéticos, gerados pelos plasmons de superfície, em sistemas constituído de nanopartículas agregadas, conforme discutido no Capítulo 5.1.1 e 5.3.3. Ambos têm um papel fundamental para o mecanismo EM do efeito SERS quando há uma condição de ressonância entre a radiação excitante e a banda de ressonância plasmônica ou de acoplamento plasmônico.

Conforme discutido no Capítulo 5.3.1, as cito-AuNPs apresentam uma população maior de partículas com diâmetros maiores que 50 nm, em relação as cito-AuNPs. Tais nanopartículas possuem maior eficiência de extinção da luz na região acima de 630 nm. Portanto, utilizando comprimentos de onda de excitação na região do vermelho seriam esperados fatores de intensificação maiores para o efeito SERS das cito-AuNPs, uma vez que a contribuição do efeito EM seria maximizada pela condição de ressonância entre a banda plasmônica dessas partículas e a radiação incidente.

O forte sinal SERS observado para as partículas ceto-AuNP e a ausência de sinal para as cit-AuNPs, ambas fora da condição de agregação, vai contra as expectativas, e não podem ser explicados em função do mecanismo EM. Além disso, a dependência com o comprimento de onda de excitação do efeito SERS nas ceto-AuNPs, mostrada na Figura 63, apresenta alguns aspectos contrastantes, que não podem ser interpretados apenas com base no mecanismo EM. Como a ACDC não apresenta transições eletrônicas na região do visível, a contribuição do mecanismo RR pode ser prontamente descartada. Assim sendo, o forte espectro SERS observado em 633 e 785 nm só pode ser interpretado em termos do mecanismo químico de transferência de carga, envolvendo excitações no sistema ceto-AuNP, ou então assumindo um mecanismo químico não ressonante baseado no aumento de polarizabilidade causado por interações entre os estados fundamentais do ligante e das nanopartículas metálicas. Como um mecanismo não exclui o outro, ambos podem estar atuando ao mesmo tempo.

De fato, os cálculos teóricos mostram que a ACDC possui orbitais de fronteiras capazes de interagir com os átomos superficiais das nanopartículas, e promover excitações de transferência de carga no nível de Fermi. A existência de equilíbrio ceto-enólico para a ACDC torna-se relevante para a discussão dos modos de interação com os átomos metálicos, Figura 64, e para uma possível contribuição do mecanismo CT para o efeito SERS.

Figura 64: Equilíbrio ceto-enólico para ACDC

Para compostos 1,3-dicarboxílicos, como a ACDC, é comum a existência de enóis termodinamicamente estáveis, devido a deslocalização eletrônica no enol intensificada pelo efeito indutivo dos dois grupos carboxilato e possível formação de ligação de hidrogênio intramolecular.²⁰¹ A coordenação da ACDC com os átomos de ouro deve ocorrer preferencialmente na forma de enol, devido à disponibilidade de átomos de carbono mais doadores. A partir dessa hipótese, foram feitos cálculos teóricos de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 3.1.8, das possíveis conformações da ACDC, na forma enólica, em função do grau de desprotonação.

A Figura 65, mostra algumas das formas possíveis da ACDC na forma enólica. Os orbitais de fronteira mostram uma dependência com o grau de distorção e a força da ligação de H. Nota-se que o enol apresenta o HOMO localizado nos carbonos da dupla ligação, enquanto que o LUMO é localizado nas ligações C-O. No caso da estrutura distorcida e desprotonada não há ligação de H e formação do anel de 6 membros, dessa forma, o HOMO concentra-se preferencialmente nos oxigênios. Assim sendo, interações controladas por cargas devem acontecer pelos oxigênios e apresentar um caráter duro. Enquanto que interações com ácidos moles, como ouro, devem ser governadas pelos orbitais de fronteira localizados nas ligações C=C.

Figura 65: Orbitais de fronteira para as diferentes conformações da ACDC na forma enólica.

De fato, os cálculos teóricos da estrutura Au₂₀-enol confirmam a formação da ligação Au-C através do orbital molecular localizado na ligação C=C, Figura 66. A consequência dessa interação é uma maior polarizabilidade calculada para o sistema contendo o cluster de ouro em relação ao ligante livre, Tabela 9.

Interações entre os estados eletrônico são plausíveis e ocorrem independente de qualquer excitação no sistema. Elas podem levar a um aumento na polarizabilidade, intensificando o espalhamento Raman pelo mecanismo químico não ressonante. O fator de intensificação para esse tipo de mecanismo, estimado pela Equação 41, é de aproximadamente 80 vezes, o que explicaria a alta intensificação do espalhamento Raman medido experimentalmente.

Tem sido reportado que sistemas considerando piridinas e seus derivados, N₂, CO, CS e NH₃ como ligantes e um cluster de Au₂₀ apresentam fatores de intensificação tipicamente menores do que 50, dependendo do substituinte na posição *para* da piridina e da capacidade de formação de retro-doação.⁴⁷

Figura 66: Orbitais moleculares do sistema Au₂₀-enol

Tabela 9: Polarizabilidade calculada para o sistema Au₂₀-enol e para o enol livre

	α_{xx}	α_{xy}	α_{yy}	α_{xz}	α_{yz}	α_{zz}	HOMO-LUMO gap
Au ₂₀ -enol	831,402	3,80	793,458	24,932	30,475	903,733	0,06809
Enol livre	113,685	3,960	79,266	2,145	1,119	52,592	0,20473

O valor, relativamente alto, para o fator de intensificação do mecanismo CHEM, encontrado para o sistema Au₂₀-enol é devido à existência de um sistema π com densidade eletrônica altamente deslocalizada e a presença da forma enólica da ACDC, contribuindo para uma ligação Au-C mais forte. Tais características levam a um aumento da polarizabilidade. Todavia, apesar do grande número de trabalhos teóricos que tentam explicar a natureza das interações entre o ligante e os clusters metálicos suas características ainda não são claras e sua contribuição real para o momento de transição de polarizabilidade do efeito SERS não pode ser facilmente incluída.

Por outro lado, o mecanismo CT depende da existência de transições eletrônicas permitidas entre a AuNP e o ligante. Segundo os cálculos de TD-DFT, para o sistema Au₂₀-enol, deve haver uma transição de transferência de carga na faixa de 500 a 800 nm, Figura 67. Essa transição apresenta um caráter ligante-metal e os elétrons são transferidos do HOMO, localizado na ligação C=C do enol, para os orbitais LUMO triplamente degenerados, localizados no cluster de ouro, Figura 66.

Utilizando o método de diferença de densidade eletrônica^{42,50} para evidenciar as diferenças na distribuição de cargas entre o estado fundamental e os estados eletrônicos excitados é possível acompanhar as mudanças na distribuição eletrônica que acompanham a transição. Considerando os três primeiros estados excitados envolvidos na transição, o estado de transferência de carga apresenta os elétrons movendo-se do sistema π do enol para o cluster metálico, Figura 67B, e uma reorganização de cargas devido às transições intraclusters.^{42,43,50} A carga no estado excitado está concentrada nas pontas dos clusters. Para partículas grandes esse fenômeno é conhecido como *lighting rod effect* e tem sido provado por DDA.¹¹³

Figura 67: A) Estrutura otimizada B) representação do estado de transferência de carga para o sistema Au₂₀-enol. As superfícies ciano representam os buracos e as superfícies roxas representam os elétrons. C) Espectro eletrônico calculado.

Em contraste, para o sistema Au₂₀-citrato, as transições eletrônicas calculadas apresentam uma reorganização de cargas mais pronunciada, e uma menor contribuição de transições de transferência de carga, Figura 68. Isso pode ser causado devido a menor contribuição dos orbitais do citrato para os orbitais de fronteira do sistema ligante-partícula. Isto indica que a interação entre o citrato e os átomos de ouro apresenta um caráter mais duro, sendo governada pelas interações eletrostáticas entre as espécies. A menor contribuição do citrato para o estado excitado explica o resultado experimental observado, ou seja, a falta de sinal SERS para as cit-AuNPs não agregadas.

As evidências teóricas e experimentais confirmam que a interação entre o enol e os átomos de ouro superficiais, no caso das cet-AuNPs, é governada pelo orbital de fronteira localizado na ligação C=C do enol, gerando transições de transferência de carga ligante-metal. Isso leva a uma intensificação mais pronunciada do sinal SERS através da maximização do termo referente ao mecanismo CT na Equação 42, quando a excitação é feita nos comprimentos de onda de 633 e 785 nm.

Em 633 nm, a excitação está em pré-resonância com a banda plasmônica das AuNPs e em ressonância com a transição de transferência de carga, contribuindo para o maior fator de intensificação do sinal SERS, Figura 63. Nesse comprimento de onda, a contribuição simultânea dos mecanismos EM, CT e CHEM é plausível. Comparativamente, em 785 nm o sinal SERS não é

tão forte como em 633 nm, uma vez que o comprimento de onda de excitação está totalmente fora da condição de ressonância com os plasmons superficiais das nanopartículas, porém está em condição de pré-ressonância com as transições de transferências de cargas calculadas. Portanto, quando a excitação é feita em 785 nm apenas os mecanismos CT e CHEM contribuem para o fator de intensificação do efeito SERS.

Figura 68: A) Estrutura otimizada B) Representação do estado de transferência de carga para o sistema Au₂₀-citrato. As superfícies em ciano representam os buracos e as roxas, os elétrons. C) Espectro eletrônico calculado.

Em 532 nm, o laser está em ressonância com a absorção dos plasmons de superfície das partículas isoladas, porém está fora da região de ressonância das transições CT. Nesse caso não foi observado espectro SERS para o sistema ceto-AuNP, indicando que o mecanismo eletromagnético não é efetivo. Isso ocorre devido ao alto valor da parte imaginária da constante dielétrica do ouro nesses comprimentos de onda, o que leva a uma auto-absorção da radiação espalhada pelas partículas. Além disso a falta de ressonância com as transições de transferência de carga contribui para a baixa contribuição do efeito químico. Esses resultados mostram um caso único de sistemas coloidais, no qual a contribuição do efeito químico através das transferências de carga, manifesta-se independentemente da contribuição do efeito EM.

Como as cit-AuNPs isoladas não apresentam espectro SERS, com objetivo fazer a comparação com as ceto-AuNPs, foi necessário induzir a agregação das partículas através da mudança da força iônica do meio. Na Figura 69 são apresentados os espectros SERS e de extinção

das partículas em condição de agregação, na qual a concentração de NaCl é igual a 1 mmolL^{-1} e 1.2 mmolL^{-1} para a cit-AuNP e ceto-AuNP, respectivamente.

Figura 69: Espectro de extinção das ceto AuNP (A) e citAuNP (B). (C) Comparação entre o espectro SERS da cit-AuNP (topo) e ceto-AuNP (abaixo) em condição de agregação

Tabela 10: Atribuição tentativa dos modos normais da ACDC, coordenada na superfície das ceto-AuNP, feita com base nos cálculos teóricos.

ceto-AuNP SERS	Enol distorcido	Atribuição
		$\nu\text{C}^1=\text{O}^{13} + \delta\text{C}^1\text{O}^{12}\text{H}^{13}_{\text{ip}}$
		$\nu\text{C}^8=\text{O}^{15} (\text{vs}) + \delta\text{O}^{14}\text{H}^{10}_{\text{ip}}$
1579	1592	$\nu\text{O}^{10}\text{C}^1\text{O}^{11}_{\text{ass}}$
		$\delta\text{O}^{11}\text{H}^{12}_{\text{ip}} + \nu\text{C}^5=\text{C}^6(\text{w})$
1557		$\nu\text{C}^5=\text{C}^6 + 2(\delta\text{O}^{11,14}\text{H}^{12,10})_{\text{ip}}$
	1492	$\nu\text{C}^5=\text{C}^6 + \nu\text{C}^8-\text{O}^{13} + \delta\text{C}^6\text{H}^7$
	1469	$\nu\text{C}^8-\text{O}^{13} + \nu\text{C}^5=\text{C}^6 + \text{CH}_2\text{sci}(\text{w})$
1442		$\nu\text{C}^8=\text{O}^{15} (\text{vw}) + \delta\text{O}^{14}\text{H}^{10}$
		$\text{CH}_2\text{sci} + \nu\text{C}^6-\text{C}^8 + \delta\text{C}^5\text{C}^6\text{H}^7 + \nu\text{C}^5-\text{C}^9$
	1392	CH_2sci
1369	1345	$\delta\text{C}^5\text{C}^6\text{H}^7 + \text{CH}_2\text{twist}$
1271	1291	$\delta\text{O}^{11}\text{C}^1\text{O}^{10} + \nu\text{C}^1-\text{C}^2$
		$\text{CH}_2\text{wagg} + \delta\text{C}^8\text{C}^6\text{H}^7 (\text{vw})$
1231		$2(\nu\text{C}^{1,8}-\text{O}^{11,14}) + 2(\nu\text{C}^{1,6}-\text{C}^{2,8}) + 2\text{CH}_2\text{wagg} + \delta\text{O}^{14,11}\text{H}^{10,12}$
	1206	$\text{CH}_2\text{wagg} + \nu\text{C}^6-\text{C}^8 + \nu\text{C}^8-\text{O}^{10}$
	1145	CH_2twist
1124	1122	$\nu\text{C}^8=\text{O}^{11} + \nu\text{C}^5-\text{O}^9 + \nu\text{C}^6-\text{C}^8 + \text{CH}_2\text{twist}$
		$\delta\text{C}^8\text{C}^6\text{H}^7 + \text{CH}_2\text{twist}$
		$\delta\text{O}^{11}\text{H}^{12}_{\text{op}}$
1004		$\nu\text{C}^2-\text{C}^5 + 2(\nu\text{C}^{5,8}-\text{O}^{9,14}) + \text{CH}_2\text{rock}(\text{vw})$
	944	$\nu\text{C}^2-\text{C}^5 + \nu\text{C}^6-\text{C}^8 + \text{CH}_2\text{rock}$
928		$2\nu\text{C}^{5,8}-\text{O}^{9,14} + \text{CH}_2\text{rock} (\text{s})$
		$\text{CH}_2\text{rock} + \nu\text{C}^8-\text{O}^{14} + \delta\text{C}^2\text{C}^5\text{C}^6$
855		$\nu\text{C}^1-\text{C}^2 + \nu\text{C}^8-\text{O}^{14} + \nu\text{C}^1-\text{O}^{11} + \delta\text{O}^{13}\text{C}^1\text{O}^{11}$
808	844	$\nu\text{C}^1-\text{C}^2 + \delta\text{O}^{11}\text{C}^1\text{O}^{10} + \delta\text{C}^2\text{C}^5=\text{C}^6_{\text{op}}$
	768	$\delta\text{long chain}_{\text{oph, op}}$
		$\delta\text{long chain}_{\text{ip}} + \delta\text{O}^{11}\text{H}^{12}_{\text{ip}} + \delta\text{O}^{14}\text{H}^{10}_{\text{op}}$
	744	$\delta\text{long chain}_{\text{iph, op}}$
718		$\delta\text{C}^6\text{H}^7_{\text{op}} + \delta\text{ring}$
	680	$\delta\text{C}^6\text{H}^7_{\text{op}}$
	662	$\delta\text{long chain}_{\text{ip}} + \delta\text{O}^{12}\text{C}^8\text{O}^{13}_{\text{ip}}$
		$\delta\text{O}^{14}\text{C}^8\text{O}^{15}_{\text{ip}} + \delta\text{O}^{13}\text{C}^1\text{O}^{11}_{\text{ip}} + \delta\text{O}^6=\text{C}^5\text{C}^2_{\text{ip}}$
600		$\delta\text{long chain}_{\text{op}} + \text{CH}_2\text{twist}$
		$2(\delta\text{O}^{14,11}\text{C}^8,1\text{O}^{15,13})_{\text{oph}}$
	584	$\text{CH}_2\text{rock} + \delta\text{O}^9\text{C}^5\text{C}_{\text{op}} + \delta\text{O}^{10}\text{C}^1\text{O}^{11}_{\text{op}}$
	546	$\delta\text{O}^{12}\text{C}^8\text{O}^{13}_{\text{ip}} + \delta\text{O}^{10}\text{C}^1\text{O}^{11}_{\text{op}}(\text{w})$
	521	$\delta\text{C}^6=\text{C}^5\text{C}^2_{(\text{op})}$
508		$\text{CH}_2\text{rock} + \delta\text{C}^6=\text{C}^5\text{C}^2$
		$\delta\text{O}^{15}\text{C}^8\text{C}^6 + \delta\text{O}^9\text{C}^5=\text{C}^6$
	435	$\delta\text{O}^{13}\text{C}^8\text{C}^6_{\text{ip}} + \delta\text{O}^9\text{C}^5=\text{C}^6_{\text{ip}} + \text{CH}_2\text{rock}(\text{vw})$
		$\delta\text{O}^{13}\text{C}^1\text{C}^2 + \delta\text{O}^9\text{C}^5-\text{C}^2$
380	375	$\text{CH}_2\text{rock} + \delta\text{C}^6=\text{C}^5\text{C}^2 (\text{w}) + \delta\text{C}^5=\text{C}^6\text{C}^8 (\text{vw})$

ν = estiramento, δ = deformação de ânculo, ip = no plano, op = for a do plano, iph = em fase, oph

= fora de fase, sym = simétrico, as = assimétrico

Para a cit-AuNP a interação entre as moléculas de citrato e os átomos superficiais das partículas de ouro é predominantemente eletrostática e como foi mostrado as transições eletrônicas no sistema Au₂₀-citrato apresentam maior caráter de transições intracluster do que de transferência de carga. Neste caso o espectro SERS é observado apenas em condição de agregação, na qual a geração de *hot-spots* é induzida e comprovada pelo aparecimento da banda de acoplamento plasmônico na região acima de 700 nm, Figura 69. Visto que o espectro SERS das cit-AuNPs agregadas já é bastante discutido na literatura,^{202–206} sua discussão será omitida.

O mecanismo EM se torna relevante em sistemas constituídos de nanopartículas agregadas, e geralmente, leva a uma intensificação do espectro Raman da molécula como um todo. O perfil observado do espectro da cet-AuNP agregada, Figura 69, utilizando laser em 785 nm é similar ao obtido para as partículas isoladas, Figura 63.

Conforme esperado, para o sistema agregado, a intensidade do espalhamento Raman observado é maior em relação ao sistema isolado, devido a contribuição simultânea dos mecanismos EM, CT e CHEM para o fator de intensificação global do efeito SERS. Para as partículas isoladas apenas os mecanismos CT e CHEM são relevantes.

6.3.2 Cinética de Troca de Ligantes na Superfície das AuNPs

Outro aspecto contrastante entre as cet-AuNP e cit-AuNP é seu comportamento cinético frente a reações de troca de ligantes na superfície das partículas. A química de coordenação de nanopartículas metálicas é essencialmente controlada pelos átomos superficiais, que apresentam orbitais disponíveis para a ligação de espécies doadoras e receptoras. Consequentemente, em muitos aspectos espera-se uma similaridade entre as nanopartículas metálicas e seus respectivos complexos, permitindo a extensão dos princípios de ácidos e bases duros e moles de Pearson^{207–}

²⁰⁹ e dos conceitos termodinâmicos baseados nos orbitais de fronteira desenvolvidos por Klopman.^{210,211}

Devido à natureza de base dura dos íons de citrato, sua interação com os átomos superficiais do ouro é governada por interações eletrostáticas, como sugerido, na seção anterior, teoricamente e por espectroscopia SERS. Em contrapartida, a coordenação da ACDC deve exibir um caráter mais covalente devido a formação da ligação Au-C através da forma enólica. Em vista disso, espera-se que os complexos formados nas superfícies das cit-AuNP sejam mais lábeis do que os complexos formados na superfície da ceto-AuNP. Com isso, as reações de troca de ligante nas superfícies das ceto-AuNPs devem ocorrer com menor velocidade em relação as reações utilizando as cit-AuNPs.

Para provar as diferenças na força de ligação entre o citrato e a ACDC, a 4-Mercaptopiridina foi empregada para o estudo da cinética de troca de ligantes, devido a sua maior afinidade com os átomos de ouro. A adição de uma solução aquosa de 4-Mpy (10^{-4} molL⁻¹, pH 6.5) à dispersão de nanopartículas, leva à substituição do citrato e da ACDC, seguida da aglomeração das partículas, dando origem a banda de acoplamento plasmônico na região acima de 700 nm, Figura 70.

De fato a cinética de substituição foi mais lenta para a ceto-AuNP do que pra a cit-AuNP, evidenciando a maior força de ligação entre a ACDC e a superfície do ouro. A posição e a forma da banda de acoplamento também são diferentes nos dois casos, por exemplo, o máximo de extinção para a ceto-AuNP é de 776 nm e para a cit-AuNP de 698 nm. Sugerindo que as diferentes cinéticas de agregação levam à formação de agregados com geometrias distintas.

Figura 70: Cinética de agregação da (A) ceto-AuNP e (B) cit-AuNP após adição de 4-Mpy $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. (C) Evolução temporal da absorvância no máximo da banda de acoplamento plasmônico para cit-AuNP (curva preta) e ceto-AuNP (curva vermelha)

O perfil e a intensidade do espectro SERS da 4-Mpy, utilizando o comprimento de onda de excitação de 633 nm, em ambas partículas são similares, Figura 70. Assim sendo, pode-se concluir que a 4-Mpy apresenta a mesma geometria de coordenação na superfície das AuNPs. Porém utilizando um comprimento de onda de excitação em 785 nm, a intensidade do espectro SERS da 4-Mpy na superfície da ceto-AuNP é maior em relação ao da cit-AuNP. Isto mostra que nesses casos, o mecanismo EM é o principal intensificador do espalhamento Raman, uma vez que utilizando a ceto-AuNP em ambos os comprimentos de onda de excitação, há uma condição de

ressonância com a banda de acoplamento plasmônico. Já quando se utiliza a cit-AuNP a condição de ressonância é atingida apenas utilizando uma excitação em 633 nm.

Figura 71: Espectro SERS de suspensão de (A) ceto-AuNP e (B) cit-AuNP na presença de 4-Mpy $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com comprimento de onda de excitação de (a) 633 e (b) 785 nm.

A alta intensidade dos modos em 999, 1093 e 1612 cm^{-1} indica uma coordenação perpendicular da 4-Mpy à superfície das partículas. Esses modos apresentariam um momento de dipolo de transição orientados perpendicularmente à superfície do ouro e, pelas regra de seleção de superfície,^{212–214} uma maior intensificação através do mecanismo EM. Com o anel piridínico perpendicular à superfície do ouro é possível existir as formas N-protonada e desprotonada. Além disso, são característicos da forma protonada. Pela intensidade desses modos em ambas as

partículas pode-se concluir que a 4-Mpy está presente preferencialmente na superfície na forma N-protonada. Contudo a menor intensidade dos modos em 1612 cm^{-1} em relação ao modo em 1093 cm^{-1} , na cit-AuNP, indica uma concentração ligeiramente menor da forma protonada. Essas diferenças podem ser a causa da diferença na geometria dos agregados. A atribuição completa do espectro SERS da 4-Mpy pode ser encontrada extensivamente na literatura^{215–224}

6.4 Conclusões

Controlando a concentração e a taxa de adição de citrato é possível sintetizar AuNPs de tamanhos próximos, porém estabilizadas com citrato ou ACDC. Tais partículas apresentam diferentes perfis do espectro SERS e cinética de substituição de ligantes na superfície.

A interação mais forte da ACDC com os átomos superficiais das partículas de ouro resulta em uma maior deslocalização eletrônica e polarizabilidade no complexo AuNP-enol, possibilitando a existência de transições de transferência de carga entre o HOMO (localizado na ligação C=C do enol) e o LUMO (localizado no cluster de ouro). Esses três fatores atuam mutuamente e contribuem para um alto fator de intensificação do efeito SERS para as partículas cet-AuNP, possibilitando a observação do espectro SERS das partículas isoladas. Esses resultados mostram um caso não trivial onde a intensificação de efeito SERS ocorre essencialmente devido ao mecanismo CT e CHEM.

Adicionalmente, a coordenação da ACDC na superfície do ouro via ligação C=C é responsável pela formação de complexos mais inertes, fato comprovado por uma velocidade de troca de ligante superficial menor. Em contra partida, a ausência de transições CT, o baixo sinal SERS e a rápida troca de ligantes na superfície evidenciam a fraca interação, de caráter mais eletrostático, entre o citrato e os átomos superficiais de ouro. Essas diferenças no grau de covalência de ambas

as espécies pode ser a causa do menor tempo de vida das oscilações plasmônicas observado para as cetona-AuNPs, discutidas no Capítulo 5.3.2.

Portanto, foi introduzido um quarto papel para o citrato dentro da síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich: o controle da labilidade dos complexos superficiais, formados durante o processo de síntese das nanopartículas. Com esse controle, acredita-se ser possível manipular a geometria de moléculas na superfície através de reações de trocas de ligantes. Dessa forma, para molécula mais complexas haveria a possibilidade de controle da sua atividade na superfície de nanopartículas, através da manipulação da geometria de coordenação. Esse conceito será abordado no próximo capítulo utilizando a molécula de etanobis(tioamida) como modelo.

7 Química de Coordenação de Superfície: Cinética de Troca de Ligantes

7.1 Introdução

7.1.1 Monocamadas Auto-Organizadas em Superfícies

Superfícies merecem um tratamento especial por apresentarem um grande gradiente de propriedades além de formarem a interface com moléculas, gerando diferentes valores de energia livre, estados eletrônicos, reatividades, mobilidades e estruturas.²²⁵ Nos materiais convencionais, a estrutura como um todo acaba determinando a maioria das propriedades, como condutividade elétrica, iônica, térmica, dureza e plasticidade. Porém na escala nanométrica, as propriedades físicas e químicas dependem, em sua grande parte, das características de superfície e da sua interface, uma vez que a porcentagem de átomos na superfície cresce à medida que o tamanho das partículas diminui.²²⁶

Superfícies metálicas nuas tendem a adsorver camadas de matérias de modo a diminuir sua energia livre, tal matéria é conhecida como adsorbato. Estes atuam de forma a alterar as propriedades interfaciais e apresentam uma significativa influência na estabilidade de nanoestruturas.^{66,227–229} Materiais orgânicos podem agir como uma barreira física ou eletrostática contra a agregação, decrescendo a reatividade dos átomos superficiais ou atuando como um filme isolante.

Superfícies revestidas de maneira accidental não são bem definidas, não apresentando propriedades químicas e físicas específicas e reprodutíveis. A formação de monocamadas automontadas (*self-assembled monolayers* - SAMs) é um método conveniente, flexível e simples para a manipulação das propriedades interfaciais de metais.^{225,230}

SAMs são camadas organizadas formadas pela adsorção de moléculas orgânicas constituintes de uma fase líquida, ou gasosa, em uma superfície sólida. O adsorbato se organiza

espontaneamente em estruturas quase cristalinas. Os ligantes que formam as SAMs normalmente apresentam uma funcionalidade química, ou seja, o grupo terminal apresenta uma interação específica com um substrato de interesse.

Para o estudo de monocamadas automontadas, as superfícies de ouro são tidas como um substrato padrão. São relativamente fáceis de preparar, tanto na forma coloidal quanto na forma de filme; não oxidam a temperaturas abaixo do seu ponto de fusão; não reagem com O₂ atmosférico, sendo possível manipulá-las em condições ambientes e; por serem substratos comuns em técnicas analíticas. Exemplo: espectroscopia SPR, microbalança de quartzo, técnicas eletroquímicas e espectroscopia SERS. Além disso, o ouro apresenta uma alta afinidade por ligantes tiolados, sugerindo uma similaridade com a química de coordenação de complexos de ouro.^{225,230}

A formação de uma monocamada densa pode ser alcançada rapidamente, a partir de soluções de ligantes em uma concentração milimolar. O tempo para a coordenação inicial na superfície metálica gira em torno de milisegundos a minutos. Porém o processo de reorganização é lento, levando horas para que a densidade de moléculas seja maximizada e os defeitos na monocamada sejam minimizados.^{231–233} Inúmeros fatores experimentais podem influenciar a estrutura e a taxa de formação das SAMs. Por exemplo: estrutura, concentração e pureza do ligante, concentração de oxigênio em solução, pureza, natureza da superfície e temperatura.^{225,230}

A temperatura é um fator importante a ser controlado, uma vez que em temperaturas abaixo de 25 °C, a cinética de formação das SAMs pode ser controlada de forma a diminuir o número de defeitos. Já em temperaturas mais altas, aumenta-se a taxa de dessorção do ligante e a de adsorção de solvente, favorecendo a reorganização do ligante na superfície metálica.^{225,227}

SAMs são materiais dinâmicos que apresentam alta complexidade estrutural, especialmente quando se trata de interfaces sólido-líquido.²³⁴ A natureza da interface superfície-ligante e a química envolvida na sua formação ainda são enigmáticas. No ouro, por exemplo, não

há a formação de óxidos superficiais, portanto a ligação de tiois na superfície não envolve etapas de reduções, envolvendo principalmente uma etapa de formação da ligação Au-S. Contudo, a natureza de tal ligação e o efeito da sua formação no arranjo espacial dos grupos no retículo do ouro ainda permanece controversa.

A formação da monocamada, a partir de ligantes contendo enxofre, requer a ativação da ligação S-H ou S-S, no caso de dissulfetos.²³⁵ Estudos mostram que a coordenação do ligante à superfície leva a formação de H₂ ou, dependendo da concentração de O₂, a conversão oxidativa à água.^{236–238} Já no caso de dissulfetos, a adsorção em superfícies de Au segue um processo dissociativo e reversível, sendo que a dessorção do disulfeto e sua recombinação é um processo ativado com uma barreira de energia de aproximadamente 30 Kcal mol⁻¹.²³⁹ Contudo estudos de difração de raios-X e microscopia de tunelamento sugerem um certo grau de ligação S-S entre os sítios adjacentes na superfície do ouro.^{235,240} Porém devido a evidências mais recentes esse modelo de quase-bisulfito vem sendo abandonado.²⁴¹

O mecanismo de formação das SAMs requer o entendimento de fatores cinéticos e termodinâmicos. Apesar da sua dinâmica de formação não ser totalmente conhecida, é aceito de forma indiscutível, que o processo de formação das SAMs envolve um balanço energético das interações covalentes entre o ligante e a superfície do ouro e interações laterais não-covalentes entre os ligantes.^{225,230} Dessa forma, a organização da camada orgânica ocorre de forma a maximizar as interações covalentes na superfície, diminuindo sua energia livre superficial e as interações atrativas (forças de van der Waals e ligações de H) entre os ligantes, otimizando as condições geométricas impostas pela superfície.

A complexidade desse balanço de interações em solução dificulta a caracterização da dinâmica do processo. Contudo alguns estudos apontam que a auto-organização das moléculas segue uma cinética que pode ser aproximada qualitativamente pelo modelo de adsorção de Langmuir. Porém em termos quantitativos essa aproximação não representa a realidade.^{242,243}

Além disso, o processo de recobrimento da superfície envolve um equilíbrio termodinâmico entre o ligante na superfície e seu precursor livre em solução. Portanto, a concentração do ligante, a presença de impurezas e irregularidades na superfície complicam os estudos cinéticos em solução.

Devido à existência de tal equilíbrio, as moléculas que formam as SAMs podem ser substituídas gradualmente quando expostas a soluções que contém outro ligante. Porém essa estratégia geralmente leva à formação de camadas heterogêneas, mas é uma rota interessante para gerar novas superfícies em substratos que já apresentam uma monocamada, sendo amplamente utilizada para a funcionalização de nanopartículas em suspensão. A reação de troca de ligante pode ser aproximada por uma cinética de pseudo-primeira ordem.²⁴⁴ Contudo, deve-se levar em consideração parâmetros como tamanho do ligante, grau de organização, topografia da superfície e as interações intermoleculares.

7.1.2 SAMs como Camadas Superficiais de Nanopartículas

Um dos aspectos que difere as nanopartículas em relação às superfícies estendidas é a porcentagem de átomos superficiais. Para partículas de 1.3 nm, cerca de 88% dos átomos encontram-se na superfície. Conforme o tamanho das partículas cresce, essa porcentagem decai exponencialmente, chegando a apenas 2% para partículas com 50 nm.

Os estados eletrônicos dos átomos interfaciais de uma nanopartícula influenciam as propriedades químicas, eletrônicas e ópticas, como visto nos capítulos anteriores. Sendo assim, os átomos superficiais também influenciam na formação das SAMs em nanopartículas. Contudo o principal fator não é o tamanho da partícula e sim a curvatura da superfície, que determina a estrutura da monocamada formada, além da natureza das interações químicas entre os ligantes e os átomos superficiais.^{225,227}

Há basicamente duas rotas de formação de SAMs em nanopartículas. A primeira seria a síntese das AuNPs utilizando um sal redutor e um agente estabilizante (conforme discutido no Capítulo 4), seguida pela troca da camada passivante pelo ligante de interesse, normalmente um tiol funcionalizado. A segunda metodologia seria realizar a síntese da partícula utilizando o ligante de interesse como agente estabilizante e controlador da forma.^{228,229,227} A primeira rota é mais utilizada, uma vez que há inúmeros protocolos de sínteses de AuNP, facilitando o controle de forma e tamanho. Porém, grande parte das pesquisas envolvendo nanopartículas, têm sido feitas sem um conhecimento detalhado da estrutura da camada orgânica em sua superfície.

AuNPs maiores que 0.8 nm podem apresentar estruturas cristalinas do tipo octaedro truncado ou cubooctaedro, sendo que as faces expostas apresentam índices de Muller {111} ou {100}. O raio de curvatura dessas estruturas e o empacotamento atômico nas faces causam a diminuição da densidade de cadeias apontadas para fora da superfície.²²⁷ Para n-alcanotióis essa diminuição leva a um aumento da mobilidade do grupo terminal, que passa a ocupar a área de um cone, devido a rotação do grupo tiol, Figura 72. Medidas do raio hidrodinâmico de nanopartículas com SAMs sugerem a formação de uma camada menos empacotada, devido a essa curvatura.²²⁵

A dinâmica dos processos de troca de ligante na superfície de AuNP é um ponto controverso na literatura e vários formalismos já foram utilizados para ajustá-la aos resultados experimentais, incluindo mecanismos de pseudo-primeira ordem e de segunda ordem^{233,245,246}, modelos de Langmuir²²⁵ e biexponenciais.^{247,248}

Figura 72: (A) Modelo de um cluster de Au_{140} com uma estrutura octaédrica. (B) Configurações de equilíbrio para SAMs de dodecanotiol em clusters de Au_{140} obtidas por dinâmica molecular: 350 K (esquerda) e 200 K (direita). (C) Esquema da estrutura de SAM em nanopartículas de alta curvatura superficial.²²⁵

7.1.3 Termodinâmica e Equilíbrio de Formação em Complexos de Metais de Transição

A estruturação das monocamadas envolve a formação de complexos na superfície metálica, na qual há ocorrência de ligações covalentes entre os átomos superficiais e os ligantes. Os sítios de coordenação desses átomos não estão completos, permitindo a ligação de espécies doadoras-receptoras nas superfícies das partículas. A afinidade de nanopartículas de ouro por ligantes tiolados, por exemplo, sugere uma similaridade com a química de coordenação do

correspondente íon metálico.^{24,25,40,227} Portanto, a aplicação dos conceitos de ácidos e bases duros e moles²⁰⁷ pode ser útil para o entendimento da química de coordenação de nanopartículas.

Segundo Klopman, as reações de formação de complexos podem ser tratadas com base na teoria de perturbação polieletrônica, envolvendo tanto reagentes como solventes.^{210,211} Tal tratamento leva à racionalização do conceito de ácido e bases duros e moles, observado empiricamente por Pearson²⁰⁷ e ao entendimento do processo de coordenação, do ponto de vista cinético e termodinâmico.

Quando dois reagentes se aproximam, há uma perturbação mútua dos orbitais de ambos. Quando dois sistemas M e L interagem entre si através dos átomos m e l, a energia da perturbação total produzida será causada por dois efeitos distintos, representados no Esquema 1:

- a. Efeito de vizinhança devido à interação através da formação de pares iônicos sem que ocorra nenhuma transferência de carga ou elétron.
- b. Transferência parcial de cargas causada pela sobreposição dos orbitais de fronteira formando ligações.

Esquema 1

Desconsiderando qualquer interação intermolecular envolvendo átomos que não sejam os átomos m e l, o efeito de vizinhança pode ser calculado pela Equação 43, onde H_1 é o hamiltoniano de perturbação, dando em função da interação das cargas ou de dipolos presentes nas espécies, e ψ_L e ψ_M são as funções de onda não perturbadas do metal e do ligante. Essa equação leva em consideração a interação coulômbica e uma possível dessolvatação que envolve a aproximação de M e L.

$$\Delta E_{(1)} = \int \psi_L \psi_M H_1 \psi_L \psi_M d\tau$$

Equação 43

Resolvendo a Equação 43 tem-se que a variação de energia causada pela aproximação das cargas, sem que haja qualquer transferência de carga, será proporcional as cargas do sistema (q_l e q_m) e apresentará um termo de dessolvatação, Equação 44. Onde Γ é o termo de repulsão coulômbica entre m e l, e ϵ a constante dielétrica do meio.

$$\Delta E_{(1)} = -q_l q_m \frac{\Gamma}{\epsilon} + \Delta_{solvatação}$$

Equação 44

O efeito de transferência de carga é produzido pela sobreposição dos orbitais moleculares de M e L, levando à formação de uma ligação covalente e diminuição do caráter iônico. Tal interação causa a dessolvatação das espécies inicialmente carregadas. A contribuição desse termo para a variação de energia do sistema é calculada considerando separadamente a perturbação que cada orbital do ligante (ψ_l) causa nos orbitais do metal (ψ_m), gerando um orbital molecular perturbado (ψ_{lm}), dado pela Equação 45.

$$\begin{aligned} \psi_{lm} &= a\psi_l + b\psi_m \\ a^2 + b^2 &= 1 \end{aligned}$$

Equação 45

Quando ψ_l apresenta dois elétrons (HOMO) e ψ_m está vazio (LUMO) a variação de energia (ΔE_{lm}) é dada pela diferença entre a energia dos dois elétrons no novo orbital e a energia deles na ausência de interação entre os orbitais ψ_l e ψ_m , ou seja quando $a=1$ e $b=0$, Equação 46.

$$\Delta E_{lm} = \int \psi_{lm}(1)\psi_{lm}(2)H\psi_{lm}(1)\psi_{lm}(2) d\tau - \int \psi_l(1)\psi_l(2)H_0\psi_l(1)\psi_l(2)d\tau$$

Equação 46

Na equação acima os números 1 e 2 indicam os elétrons, H é o Hamiltoniano do sistema LM perturbado e H_0 é o hamiltoniano do ligante isolado. Resolvendo a Equação 46 e somando a Equação 44 obtém-se uma equação geral para a variação de energia de uma reação de complexação, Equação 47. Onde o primeiro termo é referente à interação eletrostática entre o metal e o ligante e o segundo é a contribuição das energias de solvatação e dessolvatação, incluindo a liberação de moléculas de solvente. O terceiro termo é a contribuição da transferência de carga, ou seja, a contribuição da formação de uma interação covalente entre o metal e o ligante. Nele β é a integral de sobreposição dos orbitais ψ_m e ψ_l ($\langle \psi_l | H_1 | \psi_m \rangle$) e c_r^l e c_r^m são os coeficientes de combinação das funções de onda. E ($E_l^* - E_m^*$) representa a diferença de energia entre o HOMO o ligante, ψ_l , e do LUMO do metal, ψ_m .

$$\Delta E_{total} = -q_l q_m \frac{r}{\epsilon} + \Delta_{solvatação} + \sum_l \sum_m \left[\frac{2(c_r^l)^2 (c_r^m)^2 \beta^2}{E_l^* - E_m^*} \right]$$

Equação 47

Deve-se ressaltar que esse tipo de tratamento é universal, servindo para qualquer interação entre um doador e um receptor de elétrons. Além de racionalizar o conceito de ácidos e bases duros e moles, explica a ordem de nucleofilicidade e eletrolicidade observada em reações orgânicas. Portando L pode representar qualquer nucleófilo e M qualquer eletrófilo.

O caráter ácido-base duro e mole pode ser explicado a partir da diferença de energia entre os orbitais de fronteira, quando essa for grande ($|E_l^* - E_m^*| \gg 4\beta^2$), a diferença de energia entre todos os pares de orbitais do metal e ligante será grande. Sendo assim o fator b da Equação 45 tende a zero e a transferência de carga será pequena. Nesse caso a perturbação será determinada pela carga total dos dois reagentes. Consequentemente a reação será controlada pela interação

iônica entre as espécies. Sendo predominante em espécies com alta carga, E_I^* baixa, ou seja, quando o ligante for difícil de ionizar ou polarizar; quando E_m^* for alta, ou seja, o metal apresentar baixa tendência de receber elétrons e; quando ambos os reagentes forem fortemente solvatados. Adicionalmente nesse caso, β será baixo, indicando uma baixa tendência de formação de ligação covalente. Tal interação caracteriza a reação entre duas espécies duras.

Quando os orbitais de fronteira apresentarem energias muito próximas, $|E_I^* - E_m^*|$ tenderá a zero e a interação entre os átomos será predominantemente covalente, com uma forte transferência de carga entre os reagentes. Esse tipo de reação pode ser chamada de reação controlada por orbitais de fronteira. Nesse caso os ligantes devem ser pouco eletronegativos, enquanto que os metais altamente eletronegativos. Além disso, os orbitais das espécies devem apresentar uma boa sobreposição. A reatividade será determinada essencialmente pela densidade eletrônica dos orbitais de fronteira e a reação geralmente ocorre entre espécies neutras ou com baixa carga, altas polarizabilidades e baixas energias de solvatação.

A Tabela 11 resume os tipos de interação ligante-metal e suas características em relação aos parâmetros discutidos até então.

Tabela 11: Resumo dos tipos de interações metal-ligante e suas características.

Ligante-Metal	Ligante (E_I^*)	Metal (E_m^*)	$ E_I^* - E_m^* $	Γ	β	Reatividade
Mole-Duro	Alta – orbital grande	Alta – orbital pequeno	Média	Pequena	Muito pequena	Baixa
Mole-Mole	Alta – orbital grande	Baixa – orbital grande	Média	Muito Pequena	Grande	Controlada por orbitais de fronteira -Alta
Duro-Duro	Baixo – Orbital pequeno	Alta – orbital pequeno	Grande	Grande	Pequena	Controlada por Carga – Alta
Duro-Mole	Alta – orbital grande	Baixa – orbital grande	Média	Pequena	Muito Pequena	Baixa

Por se tratar de uma teoria genérica e pela semelhança entre as propriedades químicas das superfícies de nanopartículas metálicas e seus respectivos complexos, este capítulo usará uma

abordagem de química de coordenação para a reação de troca de ligantes em nanopartículas metálicas.

Será estudada a troca da camada de citrato ou acetonadicarboxilato existente na superfície das AuNPs, conforme comprovado no Capítulo 6, pela molécula de etanobis(tioamida) (ditiooxamida). Primeiramente o estudo será abordado teoricamente através de cálculos de DFT, a discussão será feita com base nas propriedades da ditiooxamida livre e na superfície de clusters de ouro contendo vinte átomos. Em seguida o estudo experimental da interação entre a ditiooxamida e as diferentes AuNPs será discutido com base nas cinéticas de surgimento da banda de acoplamento plasmônico e em função das variações no espectro SERS do ligante na superfície das partículas.

7.2 Parte Experimental

7.2.1 Estudo teórico

A modelagem teórica da ditiooxamida foi realizada por DFT e TD-DFT. Sendo que para a molécula livre foi utilizado o funcional B3LYP com conjunto de bases 6-311g++(d,p). Para o estudo dos modos de coordenação do ligante na superfície do ouro foi utilizado um cluster com vinte átomos de ouro com uma geometria tetraédrica com a finalidade de simular a face {100}. Os cálculos foram realizados utilizando o funcional B3LYP com o conjunto de bases 6-311g++(d,p) para os átomos de C, H, N e S. Para os átomos de Au foi utilizada a base LanL2DZ com seus respectivos valores de pseudopotencial para os elétrons das camadas internas e correções para efeitos relativísticos presente nos átomos de ouro.

7.2.2 Purificação da Ditiooxamida

Preparou-se 200 mL de solução saturada de ditiooxamida em etanol a 70 °C. Essa solução foi filtrada a quente para retirar possíveis impurezas insolúveis. Em seguida o filtrado foi resfriado a temperatura ambiente e posteriormente a temperaturas mais baixas, cerca de 8 °C, a solução foi mantida nessa temperatura por uma noite. Houve a formação de cristais alaranjados no formato de agulhas, que foram filtrados em funil de placa porosa e mantido em dessecador na presença de sílica e parafina.

7.2.3 Funcionalização das AuNP

A interação da ditiooxamida com as AuNP foi realizada misturando soluções de diferentes concentrações do ligante com suspensões de cit-AuNP ou ceto-AuNP em uma proporção volumétrica de 1:4. A concentração do ligante foi controlada para variar na faixa entre $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e $1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$. A cinética de coordenação da ditiooxamida foi acompanhada por espectroscopia eletrônica e Raman.

Para o estudo cinético por espectroscopia eletrônica foi utilizado um tempo total de 6000s com um intervalo entre cada medida de 0.5 segundos para os 200 primeiros segundos. Após 200 segundos o intervalo de tempo entre as medias foi aumentado em 10% a cada medida.

Os espectros Raman utilizando laser com comprimento de onda de 785 nm foram adquiridos com um tempo de integração de 2 minutos, 1 minuto de intervalo entre cada medida e 100 mW de potência. Trabalhando com o laser de 633 nm foi utilizado um tempo de integra de 10 segundos com intervalo de 1 segundo entre cada medida e uma potência de 20 mW.

7.3 Resultados e Discussão

A ditiooxamida (Dto) é um reagente complexante clássico utilizado em testes analíticos para cobre, cobalto e níquel.²⁴⁹ Em soluções amoniacais a Dto apresenta um equilíbrio tautomérico entre as formas ditiona e aci (di-imino), Figura 73.

Figura 73: Equilíbrio tautomérico e cis-trans da Ditiooxamida.

Devido a presença de dois carbonos com hibridização sp^2 , a dto apresenta uma conformação planar e consequentemente dois isômeros rotacionais diferentes, *cis* (C_{2v}) e *trans* (C_{2h}), como pode ser visto na Figura 73. Por apresentarem grupos de ponto diferentes, os isômeros apresentam atividades Raman distintas e alguns modos normais de vibração comuns apresentam frequências deslocadas, devido a diferentes graus de interações intra e intermoleculares. Dessa forma ambos podem ser identificados com precisão na superfície das nanopartículas de ouro. Por esta razão escolheu-se trabalhar com a ditiooxamida.

O espectro eletrônico da ditiooxamida, em água, apresenta duas bandas de absorção características. Uma larga em 490 nm, sendo uma transição $n \rightarrow \pi^*$, do orbital HOMO constituído

principalmente dos orbitais s dos átomos de enxofre para o orbital LUMO constituído pelo sistema p contendo 39% de contribuição dos carbonos, 22% de contribuição dos nitrogênios e 39% dos enxofres. A segunda transição ocorre em 310 nm e é atribuída a transição $\pi \rightarrow \pi^*$.²⁵⁰

A Dto forma complexos de campo fraco com metais de transição, e uma vez que possui características de doador π , há uma transição de transferência de carga ligante $\rightarrow$ metal. Porém, devido à simetria de seu orbital π vazio (LUMO), também pode apresentar uma transição de transferência de carga metal $\rightarrow$ ligante na região do visível. Tais transições serão a principal fonte de intensificação do espectro Raman na superfície do ouro, devido ao mecanismo químico de intensificação, descrito anteriormente.

Primeiramente será abordado o estudo teórico da ditooxamida livre e na superfície do ouro, discutindo as principais diferenças entre as possíveis conformações, geometrias de coordenação, características do complexo formado na superfície e a presença do mecanismo CHEM de intensificação do espalhamento Raman.

Em seguida, com base nos resultados teóricos, serão abordadas experimentalmente as diferenças na geometria da coordenação em função da concentração de Dto e do tipo de AuNP utilizada (cit ou ceto). Adicionalmente, na tentativa de elucidar um possível mecanismo para a interação da Dto com as AuNP foram realizados estudos cinéticos por espectroscopia no UV-Vis e Raman.

7.3.1 Estudo teórico da interação entre Dto e AuNP

A Dto foi escolhida para o estudo da cinética de troca de ligantes por apresentar uma estrutura simples, possibilitando um estudo teórico mais detalhado de suas propriedades isoladas e na superfície do ouro. Além disso, a presença de um equilíbrio *cis-trans* envolvendo

conformações com diferentes grupos de ponto enriqueceria sua investigação na superfície das AuNPs.

Primeiramente, a Dto livre na forma *cis* e *trans* foi modelada, seus diagramas de orbitais moleculares e espectro Raman foram calculados por DFT. A espécie *trans* é a forma mais estável, apresentando uma diferença de energia para a forma *cis* de cerca de 67.64 KJ/mol. Essa diferença de energia é cerca de 25 vezes maior que a energia térmica à 25 °C ($k_b T N_a = RT = 2.479 \text{ KJmol}^{-1}$), considerando uma distribuição de Boltzman, 100% das moléculas de Dto estão na conformação *trans* à temperatura ambiente.

A existência de três frequências imaginárias no espectro vibracional teórico da conformação *cis*, relacionados a rotação da ligação C-C, indica que esta não é um mínimo de energia do sistema. Contudo, suas propriedades serão discutidas, pois a coordenação na superfície do ouro pode torná-la mais estável.

Ambas as espécies possuem maior contribuição dos orbitais p dos enxofres para o HOMO, porém a forma *trans* apresenta também a contribuição dos orbitais envolvidos na ligação C-C e C-N, Figura 74. Já o LUMO nos dois casos é formado pelo sistema π^* envolvendo a molécula inteira. As características dos orbitais de fronteira fazem com que a Dto atue como doadora e receptora π , apresentando transições de transferência de carga ligante-metal e metal-ligante. Em complexos de Fe^{3+} , por exemplo, a transição metal-ligante ocorre em 550 nm e a ligante-metal em 560 nm. Ambas têm uma absorvidade molar de aproximadamente 10^3 .²⁵⁰

Figura 74: Geometria otimizada (esquerda), HOMO (meio), LUMO (direita) calculados para a Dto na forma *cis* (A) e *trans* (C). Diagrama de orbitais moleculares calculados para a forma *cis* (B) e *trans* (D).

As diferentes interações intramoleculares entre os hidrogênios são as principais causas de mudanças no comportamento vibracional entre as duas espécies.²⁵¹ Na forma *cis* há um impedimento estérico entre os hidrogênios, causando um deslocamento dos modos de deformação NH₂ no plano para maiores valores de número de onda. Já na forma *trans* não há esse impedimento e esses modos se encontram deslocados para valores de frequências menores.^{252–}
²⁵⁴ Vibrações de deformação NH₂ no plano possuem um acoplamento com modos de estiramento CN, assim sendo esses modos devem ser encontrados em frequências maiores quando a Dto encontra-se na forma *cis*.

Como pode ser visto no espectro Raman teórico, Figura 75, o modo de deformação NH₂ no plano é deslocado de 1581 cm⁻¹ para 1619 cm⁻¹, quando passa da forma *trans* para a *cis*. Por apresentar um acoplamento com os modos de deformação NH, também é observado um deslocamento para valores maiores de número de onda, para o modo de estiramento da ligação C=S, de 910 para 933 cm⁻¹.

O grupo C=S apresenta menor polaridade e uma ligação consideravelmente mais fraca, quando comparado com o grupo C=O, por exemplo. Em consequência disso os modos relativos ao grupo C=S localizam-se em frequências mais baixas e estão susceptíveis a efeitos de acoplamento. Dessa forma, quando o grupo C=S está ligado a um átomo de nitrogênio é comum a presença de

bandas de acoplamento entre os modos referentes aos grupos C-N e C=S na região de 1563 a 700 cm^{-1} . Portanto alterações nos modos envolvendo as aminas levam às alterações dos modos envolvendo a ligação C=S. Tais alterações possibilitam a identificação de qual forma da Dto está presente.

Figura 75: Espectro Raman teórico pra a dto nas formas cis (curva preta) e trans (curva vermelha), calculado por DFT.

O estudo teórico foi estendido para estruturas contendo vinte átomos de ouro em uma estrutura tetraédrica, sendo um fragmento de uma estrutura cúbica de face centrada que simula uma partícula com os planos {100} expostos.¹⁹⁵ Foram estudadas 5 diferentes geometrias de partida, representadas na Figura 76, considerando dois modos de coordenação diferentes e as duas conformações da Dto. Os cálculos que partiram da Dto coordenada ao cluster de ouro por dois pontos diferentes levaram a uma geometria otimizada na qual a dto encontra-se paralela à

superfície do ouro, adotando uma conformação plana com os átomos de enxofre interagindo com dois átomos de ouros diferentes. Tal geometria será indicada como coordenação F.

Já os cálculos que partem da Dto perpendicular à superfície, onde os átomos de enxofre e nitrogênio que interagem com a superfície da partícula estão ligados ao mesmo carbono, mantém a geometria perpendicular após o cálculo. Esta geometria de coordenação será indicada como P. É importante notar que a conformação *trans* da Dto continua sendo a mais estável e mesmo os cálculos partindo da espécie *cis*, a forma final encontrada é sempre a *trans*. Para comparação foram calculadas as propriedades da Dto na forma *cis*, coordenada em uma conformação perpendicular à superfície.

Figura 76: Estruturas de partida utilizadas na modelagem do sistema $Au_{20}Dto$ (acima). Estruturas otimizadas para o sistema $Au_{20}Dto$ (abaixo).

Comparando os valores de energia para o sistema Au_{20} -Citrato, mostrados no Capítulo 6, com os valores para os sistemas Au_{20} -*trans*Dto-F, Au_{20} -*trans*Dto-P e Au_{20} -*cis*Dto-P, observa-se uma estabilização, ou seja, uma diminuição da energia do sistema de cerca 224 hartrees ($5.8 \times 10^8 \text{ Jmol}^{-1}$). Portanto o processo de coordenação da Dto é termodinamicamente favorável. Deve-se ter em mente que essa estabilização leva em consideração apenas a diferença de energia entre as ligações nas partículas com o citrato e com a Dto, não considerando nenhum fenômeno de estabilidade do colóide.

O complexo $\text{Au}_{20}\text{-cisDto-P}$ apresenta maior energia, aproximadamente 100 KJmol^{-1} , em relação aos complexos com a espécie *trans*. Houve um aumento na diferença de energia entre as formas *cis* e *trans* da Dto, indicando que a coordenação com o ouro não torna a forma *cis* mais estável.

A diferença de energia calculada para os complexos $\text{Au}_{20}\text{-transDto-P}$ e $\text{Au}_{20}\text{-transDto-F}$ é de apenas 2.79 KJmol^{-1} . Considerando uma temperatura de 25°C a energia térmica é da ordem de 2.47 KJmol^{-1} , portanto experimentalmente, deve ser possível encontrar ambas as formas na superfície da partícula. Considerando uma distribuição de Boltzman, à temperatura ambiente deveríamos encontrar uma distribuição de aproximadamente 75% da forma *trans* e 25% da *cis*.

Apesar da pequena diferença de energia, os dois complexos da Dto na forma *trans* apresentam composições bem diferentes para os orbitais moleculares, Figura 77 e Figura 78. Na coordenação perpendicular da Dto no ouro, a ligação é formada principalmente entre o orbital p do enxofre e os orbitais d_{z^2} dos átomos de ouro, sendo que a interação principal ocorre com o átomo de ouro central, Figura 77C. Como pode ser visto, a ligação S-Au apresenta um alto caráter de ligação σ e uma baixíssima contribuição da interação π entre os orbitais p do enxofre e a banda d do ouro, evidenciado no orbital molecular 219 da Figura 77C. O LUMO é constituído, quase que em sua totalidade, pelo sistema π da Dto, e os orbitais vazios de maior energia são formados pelos orbitais d dos átomos de ouro.

Portanto no complexo $\text{Au}_{20}\text{-transDto-P}$ a Dto atua como doador σ e um receptor π , sendo assim, há uma probabilidade maior do complexo apresentar transições de transferência de carga metal-ligante. Além das transições internas do clusters, que nesse caso seriam transições intrabandas entre as bandas de valência formada pelos orbitais d preenchidos para a banda de condução formada pelos orbitais d vazios.

Figura 77: (A) geometria otimizada, (B) diagrama de orbitais moleculares, (C) HOMOs e (D) LUMOs para o complexo Au_{20} -transDtp-P.

No caso do complexo Au_{20} -transDtp-F a interação é mais complexa e a Dtp interage efetivamente com um número maior de átomos na superfície do cluster. Os quatro orbitais preenchidos de maior energia apresentam contribuição tanto da Dtp quanto do cluster de ouro. Os dois mais energéticos são formados pelo sistema π da Dtp e os outros dois apresentam contribuição dos orbitais p do enxofre. Nesse caso todas as interações apresentam um alto caráter de interação π e a Dtp atua como um doador π .

Analisando os orbitais vazios de menor energia nota-se que nessa conformação o ligante também atua como um receptor π . Portanto no complexo Au_{20} -*trans*Dto-F há possibilidade de ocorrerem transições de transferência de carga metal-ligante e ligante-metal.

Figura 78: (A) geometria otimizada, (B) diagrama de orbitais moleculares, (C) HOMOs e (D) LUMOs para o complexo Au_{20} -*trans*Dto-F.

Com base na teoria de Klopman, algumas suposições sobre a interação entre as diferentes AuNPs e a Dto podem ser feitas. A Tabela 12 resume os valores de energia dos orbitais de fronteira para os sistemas calculados no Capítulo 6 e para os sistemas envolvendo a Dto. O valor de E_i^* para a Dto livre na espécie *trans* e *cis* é de respectivamente -6.3 e -5.9 eV, podendo ser considerados como centros moderadamente moles. Os complexos Au_{20} -*trans*Dto-P e Au_{20} -*trans*Dto-F ainda podem ser considerados moderadamente moles, porém o valor de energia do HOMO de ambos,

sobe para aproximadamente -5.5 eV. Esse aumento de 0.8 eV indica uma alteração da basicidade do ligante na superfície da partícula.

Considerando que a interação ocorrerá entre o HOMO da Dto e o LUMO das partículas estabilizadas com citrato ou ACDC, o valor de $|E_l^* - E_m^*|$ pode ser estimado. A espécie mais estável da Dto é a forma *trans*, portanto a diferença de energia para a interação entre a dto e o complexo Au₂₀-cit será de 0.09193 au (2.5 eV). E com o complexo Au₂₀-enol será de 0.081829 au (2.2 eV).

Tabela 12: Valores de energia dos orbitais de fronteira para os diferentes sistemas considerados.

	HOMO (a.u.)	LUMO (a.u.)
<i>cis</i>Dto	-0,21651	-0,10869
<i>trans</i>Dto	-0,23326	-0,10897
Au₂₀-Cit	-0,21918	-0,15133
Au₂₀-enol	-0,22240	-0,15431
Au₂₀-<i>trans</i>Dto-P	-0,20641	-0,15204
Au₂₀-<i>trans</i>Dto-F	-0,20403	-0,16047

O valor de β pode ser estimado como o valor de energia dos elétrons no orbital do sistema perturbado, ou seja, no orbital HOMO dos complexos Au₂₀-*trans*Dto-P e Au₂₀-*trans*Dto-F. Então os valores de $4\beta^2$ calculados foram de 0.170420 (4.63 eV) e 0.166512 au (4.53 eV), respectivamente.

Portanto, para a interação da Dto com os clusters de ouro tem-se que o valores da repulsão coulômbica Γ na Teoria de Klopman serão pequenos uma vez que o ligante é neutro; β apresenta um alto valor, aproximadamente 430 KJ mol⁻¹, caracterizando um alto grau de sobreposição dos orbitais da Dto e do cluster de ouro. Isto corrobora com a densidade eletrônica calculada para os orbitais dos complexos com Dto e; a diferença de energia entre os orbitais de fronteira do ligante e do metal é relativamente pequena, $|E_l^* - E_m^*| < 4\beta^2$.

Dessa forma, a interação entre a Dto e os clusters de ouro é tipicamente uma interação mole-mole, na qual a reatividade será alta e controlada pelos orbitais de fronteira. Da mesma forma, já foi visto que a interação com o complexo Au₂₀-enol apresentará um grau de covalência

maior em relação a interação no complexo Au₂₀-cit, uma vez que no último caso o valor de $|E_l^* - E_m^*|$ é maior.

Através dos estudos da molécula livre, sabe-se que é possível identificar as diferentes conformações, analisando as diferenças em seus espectros Raman, causadas por diferentes interações intramoleculares. Porém será que é possível distinguir tais conformações na superfície do cluster de ouro?

Os espectros Raman calculados para os complexos Au₂₀-*cis*Dto-P e Au₂₀-*trans*Dto-P apresentam um deslocamento das frequências envolvendo principalmente os modos de estiramento C=S, indicando um caráter de ligação sigma entre o ouro e os átomos de enxofre, Figura 79. Há também o deslocamento dos modos de estiramento N-H, provavelmente causados por um maior impedimento estérico devido à proximidade a superfície do ouro. Para os modos de deformação NH₂ no plano, há um grande deslocamento para menores frequências dos modos mais afastado da superfície e um deslocamento para maiores frequências dos mais próximos. A Tabela 14 e a Tabela 15 mostram a atribuição completa dos modos normais para todos sistemas calculados.

Outro fator importante é a intensidade do espectro. É possível ver uma intensificação dos modos envolvendo os grupos C-C, C-N e C-S., enquanto que a intensidade dos modos que envolvem os grupos NH₂ não sofre grandes alterações. A formação de uma ligação com alto caráter covalente entre o cluster de ouro e a Dto, e a deslocalização eletrônica observada nos orbitais de fronteira, levam a um aumento do valor dos componentes do tensor de polarizabilidade. Como pode ser visto na Tabela 13 para os complexos com ouro há um aumento de 8 a 10 vezes em relação aos valores calculados para a Dto livre.

Tabela 13: Valores calculados para os componentes do tensor de polarizabilidades para os diferentes sistemas envolvendo a Dto.

	α_{xx}	α_{xy}	α_{yy}	α_{xz}	α_{yz}	α_{zz}
<i>cis</i>Dto	48.297	0	98.257	0	0	107.838
<i>trans</i>Dto	107.682	22.172	97.406	0	0	48.203

Au₂₀-transDto-F	819.33	2.187	814.69	42.793	-29.066	1027.151
Au₂₀-transDto-P	832.568	-38.322	863.52	96.953	-98.770	986.190
Au₂₀-cisDto-P	839.744	-36.286	856.015	105.299	-95.133	1006.220

Figura 79: (A) Comparação entre os espectros Raman teóricos da transDto e do complexo Au₂₀-transDto-P. (B) Comparação entre os espectros Raman teóricos da cisDto e do complexo Au₂₀-cisDto-P.

Tabela 14: Atribuição dos modos normais calculados para os sistemas transDto, Au₂₀-transDto-P e Au₂₀-trans Dto-F

transDto	Au₂₀-transDto-P	Au₂₀-transDto-F	Atribuição
268.6	293.1	255.8	δ_{np} . N-C-C-S
321.2	345.5	288.6	δ_{np} . S-C-C-S
373.3	390.4	288.6	δ_{fp} . C-S + δ_{fp} .NH ₂
400.2	420.1	349.0	δ_{np} . N-C-C-N
442.9	462.4	435.6	$\delta_{ass. np}$. S-C-N
		462.6	$\delta_{si. fp. ef.}$ NH ₂
464.2	410.9	504.4	$\delta_{si. fp. ff.}$ NH ₂

	583.1		$\delta_{\text{si. fp. NH}_2}$ (perto da superfície)
483.6		532.2	$\delta_{\text{si. fp. ef. NH}_2}$
624.4	608.8	591.6	$\delta_{\text{ass. fp. ff. NH}_2}$
633.0	658.1	609.1	$\delta_{\text{ass. fp. ef. NH}_2}$
650.9	677.3	673.8	$\nu\text{C-C} + \delta_{\text{si. np. C-C-S}}$
689.0	718.1	665.5	$\delta_{\text{fp. C-C}} + \delta_{\text{ass. fp. ef. NH}_2}$
834.3	846.7	834.7	$\nu_{\text{ass. C-S}} + \delta_{\text{ass. np. C-N-H}}$
905.6	921.9	932.1	$\delta_{\text{si. np. C-N-H}} + \nu\text{C-C}$
1189.4	1211.5	1205.6	$\delta_{\text{ass. np. C-N-H}}$
1270.2	1291.4	1299.3	$\nu\text{C-C} + \delta_{\text{si. np. C-N-H}}$
1357.7	1404.7	1375.7	$\nu_{\text{ass. C-N}} + \text{bending}_{\text{ass. NH}_2}$
1380.7	1430.5	1415.3	$\nu_{\text{si. C-N}} + \text{bending}_{\text{ass. NH}_2}$
1535.6	1573.9	1577.9	$\text{bending}_{\text{ass. NH}_2} + \nu_{\text{ass. C-N}}$ (apenas Au _{20-trans} Dto-P)
1566.0	1604.4	1599.3	$\text{bending}_{\text{si. NH}_2} + \nu_{\text{si. C-N}}$ (apenas Au _{20-trans} Dto-P)
3341.6	3324.9	3446.2	$\nu_{\text{si. ef. N-H}}$
3346.8	3467.3	3454.6	$\nu_{\text{si. ff. N-H}}$
3542.1	3455.7	3625.9	$\nu_{\text{ass. ef. N-H}}$
3543.9	3658.4	3640.8	$\nu_{\text{ass. ff. N-H}}$

Tabela 15: Atribuição dos modos normais calculados para os sistemas *cis*Dto e Au_{20-cis}Dto-P.

<i>cis</i> Dto	Au _{20-cis} Dto-P	Atribuição
217.6712	263.60446	$\delta_{\text{np. N-C-C-S}}$
363.24484	289.69612	$\delta_{\text{si. fp. ef. NH}_2} + \delta_{\text{si. fp. C-N}}$ (<i>cis</i> Dto)
	365.74314	$\delta_{\text{si. fp. C-N}}$
388.27992	407.43052	$\delta_{\text{si. np. S-C-N}}$
410.05668	557.81782	$\delta_{\text{np. N-C-C-N}}$
446.5248	453.28766	$\delta_{\text{ass. np. S-C-N}}$
474.20124	461.51476	$\delta_{\text{ass. fp. ff. NH}_2}$
554.84948		$\delta_{\text{si. fp. ef. NH}_2}$
602.72172	616.55216	$\delta_{\text{si. np. S-C-N}} + \nu\text{C-C}$
643.16152	634.99926	$\delta_{\text{fp. C-C}} + \delta_{\text{ass. fp. ef. NH}_2}$
	666.73236	$\delta_{\text{ass. fp. ef. NH}_2}$
856.02236	870.1819	$\delta_{\text{ass. np. C-N-H}}$

931.53248	971.28836	$\delta_{\text{si. np. C-N-H + vC-C}}$
1175.92576	1227.04386	$\delta_{\text{ass. np. C-N-H}}$
1231.01836	1280.57622	$\delta_{\text{si. np. C-N-H}}$
1292.45408	1451.58748	$v_{\text{si. C-N + vC-C}}$
1294.5556	1392.95534	$v_{\text{ass. C-N +}}$
1564.60092	1602.8537	$\delta_{\text{ass. np. N-C-C}}$
1615.81824	1737.47154	bending _{ass.} NH ₂
3448.1798	3321.18318	$v_{\text{ass. C-N}}$
3460.89496	3470.44628	bending _{si.} NH ₂
3568.8244	3490.83518	$v_{\text{si. C-N}}$
3581.97336	3660.14992	$v_{\text{si. ff. N-H}}$
		$v_{\text{si. ef. N-H}}$
		$v_{\text{ass. ff. N-H}}$
		$v_{\text{ass. ef. N-H}}$

Há diferenças marcantes entre os espectros dos complexos na superfície do ouro. Os modos de estiramento C-C entre 620 e 675 cm^{-1} estão deslocados para maiores valores de energia, nos complexos envolvendo a forma *trans*. Já para a forma *cis*, estes encontram-se deslocados para menores valores de número de onda. Isso possivelmente é causado pelo acoplamento com modos de deformação diferentes.

Outro ponto marcante no espectro, são os modos de deformação no plano do ângulo C-N-H (970 cm^{-1}), que para a forma *cis*, encontra-se deslocado para maiores valores de número de onda, devido ao impedimento estérico entre os hidrogênios das aminas. Para os dois complexos na forma *trans* esse impedimento não existe, e esse tipo de vibração encontra-se deslocado para valores menores de frequência, 924 e 915 cm^{-1} , para os complexos *Au*₂₀-*trans*Dto-P e *Au*₂₀-*trans*Dto-F, respectivamente.

O modo de estiramento C-N se encontra em 1402 cm^{-1} no complexo *Au*₂₀-*trans*Dto-F, com deslocamento para menor número de onda em relação aos dois complexos com a Dto perpendicular à superfície. Esse deslocamento pode ser causado pela formação da ligação π , envolvendo também a nuvem de elétrons π da ligação C-N, devido ao enfraquecimento da ligação, pela doação de densidade eletrônica ao ouro.

Como era previsto, os modos de deformação de ângulo NH_2 (1604 e 1737 cm^{-1}) para o complexo formado com a espécie *cis* da Dto, encontram-se deslocados para maiores números de onda, devido as interações de H intramoleculares. Para ambos os complexos envolvendo a forma *trans*, esses modos se encontram na região entre 1375 e 1600 cm^{-1} .

Como discutido no Capítulo 6.1.3.2, o fator de intensificação para o efeito SERS proveniente das interações entre os estados fundamentais das AuNPs e do ligante podem ser estimados pela Equação 41, em função das diferenças de energia entre os orbitais de fronteira na molécula livre e no complexo. Para os complexos de Dto, os fatores de intensificação do mecanismo CHEM são mostrados na Tabela 16. Por apresentar apenas caráter de doador σ e um menor grau de interação π , o complexo $\text{Au}_{20}\text{-transDto-P}$ apresenta um menor valor de fator de intensificação em relação ao complexo $\text{Au}_{20}\text{-transDto-F}$. Este, por sua vez, apresenta um caráter de doador e receptor π maiores, devido à geometria de coordenação. O complexo com a Dto na forma *cis* apresenta um valor intermediário, porém esse valor não faz sentido uma vez que o complexo $\text{Au}_{20}\text{-cisDto-P}$ não é um mínimo de energia e seus orbitais não podem ser calculados com precisão.

Figura 80: Comparação entre os espectros Raman calculados para os complexos Au_{20} -cisDTo-P (curva vermelha), Au_{20} -transDTo-P (curva preta) e Au_{20} -transDTo-F (curva verde).

Tabela 16: Fatores de intensificação para o mecanismo químico não ressonante do Efeito SERS.

	HOMO-LUMO gap	EF _{CHEM}
cisDto	0.10782	
transDto	0.12429	
Au₂₀-transDto-F	0.04356	67
Au₂₀-tranDto-P	0.05437	27
Au₂₀-cisDto-P	0.0415	45

Com foi visto, os complexos da ditiooxamida formados na superfície do ouro apresentam propriedades eletrônicas e vibracionais distintas. Sendo assim deve ser possível identificar experimentalmente qual o tipo de complexo formado na superfície das AuNP.

7.3.2 Cinética de Troca de Ligantes na superfície das Cit-AuNP

Como já citado, os complexos formados na superfície de nanopartículas de ouro passivadas com citrato são lábeis. Isto é justificado pelo fato do ouro apresentar um caráter ácido macio enquanto o citrato apresentar um caráter de base dura, segundo a teoria de ácidos e bases duros-macios de Pearson^{207,209} e a teoria de termodinâmica de equilíbrio em complexos desenvolvida por Klopman.^{210,211,255} Portanto, assim como nos complexos de ouro, a ligação Au-S é favorecida, podendo ocorrer com facilidade a troca de ligantes na superfície de AuNPs.

Essa troca causa a agregação das partículas, uma vez que o citrato, que confere carga negativa à superfície, é substituído por um ligante neutro, a Dto. Com isso a estabilidade eletrostática, conferida pela dupla camada elétrica, é perdida. Como discutido no Capítulo 5.3.2, essa agregação dá origem a uma banda de acoplamento plasmônico acima de 700 nm. Na Figura 81 são apresentadas cinéticas de agregação de AuNPs em diferentes concentrações de Dto.

Na Figura 81^a, em 300 nm observa-se a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ da Dto, já a banda referente à transição $n \rightarrow \pi^*$ é encoberta pela banda de ressonância plasmônica da cit-AuNP (525 nm). Tanto

a cinética de agregação quanto o perfil da banda de agregação são dependentes da concentração de Dto utilizada. Para concentrações entre $10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e $10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ há um deslocamento batocrômico do máximo da banda de acoplamento plasmônico conforme a concentração de Dto diminui. Já para concentrações entre $10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ e $10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ há um deslocamento hipsocrômico da banda de acoplamento plasmônico. Tal variação do perfil da banda de acoplamento plasmônico é um indicativo que a estrutura do agregado formado depende da concentração de Dto.

Figura 81: Cinéticas de troca de agregação das cit-AuNPs em diferentes concentrações de Dto. (A) $10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, (B) $10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ e (C) $10^{-5} \text{ molL}^{-1}$

Acompanhando a variação de absorbância na região de 800 nm em função do tempo, observam-se duas regiões distintas. Uma com perfil de crescimento exponencial, que pode ser atribuída à substituição do citrato pela Dto na superfície do ouro, dando início à aglomeração das partículas, Figura 81B. Conforme a troca de ligantes se estende, a carga superficial das partículas é perdida, fazendo com que se formem agregados mais densos. Assim sendo, a segunda região é marcada por um decaimento da intensidade da banda de acoplamento, causado pela agregação e precipitação das AuNPs, Figura 82A. As mudanças desse perfil temporal, de variação da absorbância em função da concentração de Dto e da temperatura serão abordados mais adiante. Primeiramente serão discutidas as variações conformacionais da Dto na superfície das AuNPs com base em seus espectros SERS.

Figura 82: Variação da absorbância da banda em 800 nm com o tempo para a reação de Cit-AuNp com dtox $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C . (A) 0 a 5500 segundos e (B) ampliação da região de 0 a 30 segundos.

A cinética de coordenação da Dto nas cit-AuNPs foi monitorada por espectroscopia Raman intensificada por superfície, utilizando λ_{exc} de 785 nm. Na Figura 83 são mostrados os espectros Raman de uma suspensão de cit-AuNP com diferentes concentrações de Dto. O tempo utilizado foi de 60 minutos, pois em tempos maiores há uma queda do sinal devido à precipitação das partículas. O espalhamento Raman da Dto na superfície do ouro é fortemente intensificado pela presença das AuNPs, evidenciando a ocorrência dos mecanismos eletromagnéticos e químicos do efeito SERS, discutidos no Capítulo 6, além do mecanismo químico fora da ressonância discutido anteriormente.

Figura 83: Evolução temporal, de 0 a 60 min, do espectro SERS adquirido para suspensões de Cit-AuNP depois da adição de ditiooxamida (A) $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$. (C) Representação da reação na superfície do ouro.

As cinéticas de agregação e dos processos ocorrendo na superfície das partículas apresentam uma escala temporal diferente. A agregação do colóide ocorre em um curto espaço de tempo, até 200 segundos dependendo da temperatura e concentração de Dto. Já a cinética dos processos de formação da monocamada de Dto na superfície da AuNP ocorre em aproximadamente uma hora, apresentando a mesma escala de tempo do processo de precipitação dos agregados formados. Isso mostra que mesmo depois da formação de agregados densos a interface AuNP-ligante-solvente é dinâmica e mudanças na sua estrutura podem ocorrer em longos intervalos de tempo.

Uma fina inspeção do espectro SERS inicial de ambas as concentrações mostra que inicialmente, a coordenação da Dto ocorre pela forma *cis*, exibindo bandas em 683 e 965 cm^{-1} que podem ser atribuídas aos modos $\delta_{\text{si. np. S-C-N}} + \nu\text{C-C}$ e $\delta_{\text{si. np. C-N-H}} + \nu\text{C-C}$, respectivamente, do complexo $\text{Au}_{20}\text{-cisDto-P}$. Além disso o deslocamento dos modos próximos à 1500 cm^{-1} para maior número de onda também pode ser um indicativo da presença do complexo *cis*.

Trabalhando em uma concentração de Dto de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, Figura 83, há o surgimento de uma banda em 466 cm^{-1} , em função do tempo. A intensidade dos picos em 733, 933 e 1470 cm^{-1} aumentam com o passar do tempo. Enquanto que os modos em 683 e 965 cm^{-1} diminuem. A diminuição da contribuição das bandas referentes ao complexo com a Dto coordenada em *cis*, indica uma diminuição da sua concentração na superfície da partícula, devido a sua conversão em outra espécie.

Os picos em 733, 933 e 1470 cm^{-1} podem ser atribuídos aos modos em 675, 924 e 1438 cm^{-1} do complexo $\text{Au}_{20}\text{-transDto-P}$. O modo em 1432 cm^{-1} é referente ao estiramento simétrico C-N do complexo $\text{Au}_{20}\text{-transDto-F}$. A banda larga na região de 1300 cm^{-1} apresenta contribuição do estiramento C-C dos três complexos calculados, porém o pequeno deslocamento para maior número de onda pode ser atribuído a presença do complexo com a Dto em *trans*, coordenada perpendicularmente à superfície. O pico intenso que surge em 466 cm^{-1} pode ser atribuído ao modo de $\delta_{\text{si. fp. ff. NH}_2}$ do complexo $\text{Au}_{20}\text{-transDto-P}$ ou ao modo $\delta_{\text{ass. fp. ff. NH}_2}$ do complexo *cis*. Todavia, sua intensidade não corresponde às intensidades calculadas, deixando dúvidas sobre a atribuição desse modo.

Analisando as mudanças no espectro SERS e a intensidade das bandas ao final do processo, conclui-se que em concentrações altas de Dto há uma conversão da forma *cis* para a forma *trans*, ambas com a Dto coordenada perpendicularmente na superfície das partículas, Figura 83C. Esse modo de coordenação maximiza a ligação da Dto nas cit-AuNPs, levando a uma maior cobertura da superfície e consequentemente a diminuição da energia superficial.

As mudanças no espectro SERS refletem os diferentes modos de coordenação da Dto na superfície do ouro. A intensificação dos modos normais é consistente com a presença do mecanismo eletromagnético, devido ao acoplamento plasmônico entre as partículas. A intensificação dos modos na região de 915-70 e 1280-1310 cm^{-1} é consistente com a presença do mecanismo químico fora da ressonância, conforme mostrado anteriormente. Já a intensificação dos modos em 466 cm^{-1} e na região de 1430 a 1500 cm^{-1} é indicativo da existência de transições de transferência de carga entre a Dto e as AuNPs.

Diminuindo a concentração de Dto para $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ as mudanças observadas em função do tempo são menores, porém ainda são indicativas de uma conversão entre as formas *cis* e *trans* perpendiculares à superfície. A dependência com a concentração indica que a concentração de Dto na esfera de coordenação externa das AuNPs é determinante para a geometria de coordenação da dto nas mesmas. Dessa forma, os ligantes da camada externa, nesse caso a *trans*-Dto, competem com os ligantes da camada interna (citrato e *cis*Dto) pelos sítios de coordenação superficiais do ouro, Figura 83.

Assim sendo, uma maior diminuição da concentração de Dto, deve levar a uma geometria de coordenação diferente. De fato, utilizando uma concentração de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, o espectro SERS observado é totalmente diferente, Figura 84, tanto dos observados experimental quanto teoricamente. O deslocamento do modo de estiramento ν C-C para 1013 cm^{-1} e o aparecimento de uma banda em 1608 cm^{-1} , referente à deformação de ângulo NH_2 , podem ser um indicativo da presença da forma *cis*. Porém, não corresponde ao espectro do complexo perpendicular. Possivelmente nesse caso a Dto coordena-se na forma *cis* em uma configuração planar. Porém não é possível comprovar isso uma vez que não foi possível calcular o espectro Raman teórico dessa conformação.

Além da diferente geometria de coordenação, em concentração de Dto de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ não são observadas mudanças do perfil espectral em função do tempo, indicando que a concentração

na esfera externa de coordenação é a principal força motriz para as mudanças estruturais observadas em concentrações altas.

Figura 84: Espectro SERS das cit-AuNP após adicionada solução de dto $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$

Em conclusão as mudanças observadas no perfil do espectro SERS, em função do tempo, sugerem uma conversão da forma *cis* para a forma *trans* coordenada em uma geometria perpendicular à superfície das partículas. Esse isomerismo é causado em função da competição dos ligantes na esfera externa de coordenação das partículas com os ligantes na superfície. De uma maneira geral a intensificação do espectro SERS é causada pela combinação dos efeitos eletromagnéticos e químicos fora da ressonância. A intensificação do modo em 466 cm^{-1} sugere a existência de transições de transferência de carga entre a Dto e as AuNPs.

Analisando os espectros teóricos da *trans*Dto livre e do complexo $\text{Au}_{20}\text{-transDto-P}$, o modo em 466 cm^{-1} , atribuído como uma deformação no plano S-C-N, possui uma simetria B_u . Sendo assim para que modos não simétricos sejam intensificados deve haver um acoplamento vibrônico juntamente com a existência de transições de transferência de carga, dessa forma a integral de acoplamento será diferente de zero, conforme discutido no Capítulo 6.1.3. Para comprovar a existência do mecanismo CT, o espectro SERS de uma suspensão de cit-AuNP tratada com dto foi adquirido utilizando λ_{exc} de 633 nm.

Como pode ser visto na Figura 85 o perfil de intensidade do espectro SERS da dto depende do comprimento de onda de excitação. Com λ_{exc} de 633 nm o modo em 466 cm^{-1} não é intensificado, porém o modo em 732 cm^{-1} apresenta uma forte intensificação. O último pode ser atribuído a uma deformação fora do plano da ligação C-C no complexo $\text{Au}_{20}\text{-transDto-P}$ (718 cm^{-1}), que apresenta um modo correspondente na *transDto* livre em 689 cm^{-1} . Esse modo normal apresenta uma simetria B_g . A intensificação de modos não simétricos de diferentes simetrias em função do comprimento de onda de excitação sugere a existência de um acoplamento vibrônico, com origem na excitação de transições de transferência de carga metal-ligante ou ligante-metal. Portanto, nesse caso o mecanismo CT de intensificação do espalhamento Raman também está presente.

É importante notar que a evolução temporal do espectro SERS utilizando um laser em 633 nm ainda é consistente com a conversão da forma *cis* na *trans* na superfície da partícula. Isto pode ser comprovado pelo desaparecimento da banda em 970 cm^{-1} e o crescimento das bandas em 940 e 732 cm^{-1} . Contudo, a maior intensidade da banda em 1430 cm^{-1} pode indicar uma maior concentração do complexo *transDto-F*. Uma vez que a diferença de energia calculada para os complexos $\text{Au}_{20}\text{-transDto-F}$ e $\text{Au}_{20}\text{-transDto-P}$ é de apenas 2.79 KJmol^{-1} , ou seja, da mesma ordem de $k_B T$, a utilização de um laser com maior energia pode alterar a população de moléculas encontradas em cada conformação, modificando o perfil do espectro SERS.

Figura 85: Espectro SERS de uma suspensão de cit-AuNP após a adição de dto $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando comprimento de onda de excitação de 633nm.

Plotando a intensidade da banda em 466 cm^{-1} em função do tempo, para concentração de dto de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e utilizando λ_{exc} de 785 nm, obtém-se uma curva que pode ser aproximada por uma exponencial simples, com um fator de correlação R^2 de 0.999, Figura 86. Essa aproximação indica que o processo de conversão superficial da forma *cis* na *trans* pode ser um processo de primeira ordem, dependendo somente da concentração de Dto. A constante de velocidade calculada para essa reação é de $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Fazendo o mesmo tratamento para os espectros adquiridos com laser de 633 nm na mesma concentração de dto, porém utilizando a banda em 732 cm^{-1} a constante calculada é de $1.3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Esse aumento de uma ordem de grandeza pode ser explicado pela maior energia do laser ou por efeitos de geração de calor localizados na superfície do ouro.^{19,256} Diminuindo a concentração de dto em 10 vezes há uma diminuição de cerca de 6 vezes na constante de velocidade. Os demais gráficos de cinética são mostrados na Figura A 8 do Apêndice 10.2.

Figura 86: Evolução temporal da banda em 466 cm^{-1} do espectro Raman de uma suspensão de cit-AuNP com dto a $10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, adquirido com λ_{exc} de 785 nm .

A ditiooxamida se liga à superfície do ouro na conformação *cis*. Pelo efeito dos ligantes na esfera externa de coordenação ela passa para a conformação *trans*, em uma geometria perpendicular à superfície. Porém como ocorre a ligação inicial da *cis*Dto na superfície das partículas?

Para estudar o início da reação de troca do citrato pela dto foram feitos estudos cinéticos em diferentes temperaturas utilizando concentrações de Dto de 10^{-3} e $10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$. A evolução da banda de acoplamento plasmônico foi acompanhada nos primeiros 200 segundos de reação, usando uma resolução temporal de 0.5 segundos. Na Figura 87 é mostrado o resultado para a temperatura de 268.15 K , os resultados para as demais temperaturas são mostrados na Figura A 9 do Apêndice 10.2.

Figura 87: (A) Espectro eletônico da reação de cit-AuNP com dto (10^{-3} molL $^{-1}$) a 268.15K. (B) Evolução temporal da absorção em 800 nm.

Calvo e Gordillo descreveram a cinética da reação de adsorção de um tiol negativamente carregado à nanopartículas de ouro em função do número de sítios livres na superfície.²⁴⁴ No caso de AuNPs passivadas com citrato a concentração do passivante é cerca de 3 vezes maior em relação a concentração de sal de ouro. Sendo assim, espera-se que o citrato forme uma monocamada homogênea na superfície da nanopartículas, e esta apresentará poucos sítios de coordenação livres.

Devido a formação de um complexo relativamente lábil entre o ouro e o citrato, um mecanismo de intercâmbio pode ser adotado para as reações de troca de ligantes. Nesse mecanismo enquanto as ligações Au-S são formadas as ligações Au-O são quebradas. O estado de transição deve apresentar ambas as espécies ligadas à superfície do ouro. Consequentemente pode-se supor que não há variação no número de sítios de coordenação livres na superfície. Portanto o número de sítios superficiais pode ser incorporado na constante de velocidade aparente, k_{app} , e a reação de troca de ligante na superfície das cit-AuNP pode ser descrita como uma reação de pseudo primeira ordem, Equação 48.

Considerando que o produto esperado é a dto coordenada na superfície das AuNPs e que a formação de tal produto leva a agregação das partículas, a sua concentração pode ser aproximada à absorbância referente as partículas de ouro agregadas.

$$\begin{aligned}
 & \mathbf{Dtox} + \mathbf{CitAuNp} \rightarrow \mathbf{ET^\#} \rightarrow \mathbf{DtoxAuNp} + \mathbf{Cit} \\
 & \frac{d[\mathbf{DtoxAuNp}]}{dt} = -\frac{d[\mathbf{Dtox}]}{dt} = k_{app}[\mathbf{Dtox}] \\
 & \int_0^t k_{app} dt = -\int_{[\mathbf{Dtox}]_0}^{[\mathbf{Dtox}]_t} \frac{d[\mathbf{Dtox}]}{[\mathbf{Dtox}]} \rightarrow -k_{app}t = \ln[\mathbf{Dtox}]_t - \ln[\mathbf{Dtox}]_0 \\
 & \ln(A_{\infty(800nm)} - A_{t(800nm)}) = -k_{app}t + \ln[\mathbf{Dtox}]_0
 \end{aligned}$$

Equação 48

Utilizando a lei de velocidade integrada, Equação 48, e linearizando as curvas de evolução temporal da banda em 800 nm, duas regiões distintas podem ser encontradas, Figura 88. Nos primeiros 20-30 segundos a reação pode ser aproximada por uma reação de pseudo primeira ordem. Nesses instantes iniciais a variação do logaritmo natural da absorbância em função do tempo pode ser aproximada por uma reta, cujo coeficiente angular será a constante aparente multiplicada por -1.

A segunda etapa da reação, após 30 segundos, a aproximação de pseudo primeira ordem falha e a agregação das partículas é determinante para a constante da velocidade da reação. Nessa etapa observa-se que a banda de acoplamento plasmônico já atingiu seu máximo havendo um deslocamento deste. Mudando a temperatura para 298.15, por exemplo, a reação se torna mais rápida e a agregação/precipitação das partículas começa antes. O aumento de energia cinética das partículas com o aumento da temperatura faz com que o número de colisões entre partículas aumente, dessa forma, a estabilidade cinética proporcionada pela dupla camada elétrica é perdida mais rapidamente.

Utilizando o formalismo introduzido por Mortimer e Eyring²⁵⁷ os parâmetros de ativação podem ser estimados plotando $\ln(k_{app}/T)$ em função de T^{-1} . O resultado deve ser uma reta com coeficiente angular igual a $\Delta H^\ddagger/R$, onde $\Delta H^\ddagger$ é a variação de entalpia no estado de transição e R é a constante dos gases; o coeficiente linear será dado por $\ln(k_b/h) + \Delta S^\ddagger/R$, onde k_b e h são a constante de Boltzman e de Planck, respectivamente, e $\Delta S^\ddagger$ é a variação de entropia no estado de transição.

No caso da reação de cit-AuNP com $dto = 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ foi calculado um decréscimo de entropia de 189.2 Jmol^{-1} , indicando que o estado de transição pode apresentar o citrato e a *dto* ligados a superfície. Deve-se considerar também que a perda de carga superficial leva a floculação das partículas, o que certamente deve contribuir para a variação negativa de entropia. A variação de entalpia calculada foi de 18 KJ mol^{-1} , não explicando a coordenação da forma *cis*, uma vez que a diferença de energia calculada entre as duas formas é de 67 KJ mol^{-1} . Contudo não foram considerados nenhum efeito de dessolvatação e solvatação para a variação da diferença de energia entre as conformações.

Figura 88: (A) Curvas cinéticas linearizadas para a reação entre cit-AuNP e dto ($10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) em diferentes temperaturas. (B) Cálculo dos parâmetros de ativação utilizando a equação de Eyring.

Para a reação utilizando uma concentração de dto igual a $10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ o perfil das cinéticas é o mesmo, e os parâmetros de ativação calculados são: $\Delta S^\ddagger = -222.7 \text{ J/mol}$; $\Delta H^\ddagger = 8 \text{ kJ/mol}$, Figura 89. A diminuição de entropia no estado de transição para a reação com menor concentração de dto é maior, em relação a reação com maior concentração. Uma possível explicação para esse fato é que a agregação das partículas ocorre em maior extensão. Isto também pode ser visto pelo fato da banda de acoplamento plamônico apresentar um deslocamento batocrômico em função da diminuição da concentração de dto, Figura 81.

Figura 89: Cálculo dos parâmetros de ativação para a reação de cit-AuNP com dto ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)

Combinando os resultados para o primeiro estágio da reação, medidos por espectroscopia eletrônica, com os resultados obtidos através dos espectros SERS para a segunda etapa da reação, um mecanismo geral para a troca de citrato pela dto pode ser proposto, Figura 90. A troca de ligante na superfície de nanopartículas estabilizadas com citrato é marcada por uma reação de intercâmbio, exibindo um estado de transição onde tanto o citrato, como a dto na forma *cis*, encontram-se coordenadas à superfície. Quando a agregação das partículas atinge seu máximo a reação de competição é favorecida, e uma alta concentração de dto na camada externa de coordenação favorece a coordenação da espécie *trans* do ligante em uma conformação perpendicular à superfície, maximizando a cobertura da superfície e diminuindo a energia superficial das partículas.

Figura 90: Representação do mecanismo de troca de ligantes na superfície das cit-AuNP.

Conclui-se que o mecanismo de troca de ligante depende da labilidade do complexo de partida presente na superfície do ouro. Complexos de ouro com citrato são lábeis, facilitando a entrada da dto, tornando a reação rápida; 30 segundos. Em contrapartida, quando um complexo mais inerte é formado na superfície, como por exemplo os complexos Au-Dto, a entrada dos ligantes da esfera externa de coordenação é lenta e o mecanismo não é mais de intercâmbio.

7.3.3 Cinética de Troca de Ligantes na Superfície das cet-AuNPs

Trabalhando com as partículas estabilizadas com ACDC, caracterizadas no Capítulo 6, ao adicionarmos dto em diferentes concentrações também observa-se a agregação das partículas devido à perda de carga superficial. Assim como no caso das cit-AuNP, a agregação foi monitorada através da banda de acoplamento plasmônico, que no caso das cet-AuNP encontra-se deslocada

para o vermelho em relação as cit-AuNPs, Figura 91. Com a diminuição de concentração também há um deslocamento batocrômico do máximo da banda de acoplamento plasmônico.

Essas diferenças no padrão de agregação indicam a formação de agregados com geometrias diferentes, que provavelmente são induzidas por uma diferente geometria de coordenação da dto na superfície do ouro.

Figura 91: Espectros de extinção de suspensões de cito-AuNP tratadas com dto: (A) $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

A cinética de agregação da cito-AuNP não apresenta o mesmo perfil da cinética da cit-AuNP, visto pela variação de absorvância da banda de acoplamento em função do tempo, Figura 92. Nesse caso, a curva não pode ser aproximada por uma exponencial simples por apresentar pelo menos dois processos distintos. Portanto não pode-se considerar que a troca da ACDC pela Dto ocorra por um mecanismo de intercâmbio.

Outra diferença marcante em relação as cinéticas de agregação das partículas estabilizadas com citrato é o tempo necessário para que a banda de acoplamento plasmônico atinja o máximo da absorção. Para as cito-AuNP esse tempo é de cerca de 400 segundos, aproximadamente 20 vezes maior que o tempo encontrado para as cit-AuNP.

A ACDC apresenta uma interação mais forte com os átomos da superfície do ouro, em relação ao citrato. A formação de uma ligação π entre a espécie enólica da ACDC e a superfície do ouro, leva à formação de um complexo mais inerte em relação ao complexo formado com o

citrato. Essa menor labilidade faz com que a reação de troca de ligantes na superfície ocorra em uma faixa maior de tempo, como já havia sido mostrado para o caso da 4-mercapto piridina no Capítulo 6.3.2. Para o caso da dto as diferenças de labilidade são mais evidentes e levam a uma diminuição da velocidade de troca de ligante de 20 vezes.

Figura 92: Variação da absorbância em 900 nm para uma suspensão de cito-AuNP após a adição de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. (A) O A 1800 segundos e (B) de 0 a 400 segundos.

Com o objetivo de estudar o mecanismo da coordenação da dto nas cito-AuNP os processos de agregação foram estudados em diferentes temperaturas. Como pode ser visto na Figura 93, a dependência dos dois processos observados é complexa, e não foi possível chegar a uma conclusão concreta a respeito do mecanismo de coordenação. O que se pode afirmar nesse caso é que o mecanismo não pode ser aproximado por uma reação de intercâmbio.

Figura 93: Evolução temporal da absorbância em 900 nm para uma solução de ceto-AuNP com $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes temperaturas.

Acompanhando a cinética de coordenação da Dto nas ceto-AuNP, por espectroscopia Raman, também observa-se um perfil diferente das cit-AuNP. Em concentrações de dto de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ há uma pequena variação de intensidade da banda em 466 cm^{-1} , Figura 94. Enquanto que para os modos em 1426 , 928 e 732 cm^{-1} a variação de intensidade é maior. A intensificação dos modos de estiramento C-N e C-C em 1426 e 732 cm^{-1} , respectivamente, é consistente com o espectro calculado para o complexo $\text{Au}_{20}\text{-transDto-F}$. Assim como o deslocamento para menor número de onda do modo de deformação do grupo C-N-H em 928 cm^{-1} . Contudo a intensidade dos modos em 1470 e 466 cm^{-1} é consistente com a presença do complexo com a Dto na forma *trans* e perpendicular à superfície da partícula.

Figura 94: Evolução temporal, de 0 a 60 min, do espectro SERS adquirido para suspensões de Ceto-AuNP depois da adição de ditiooxamida (A) $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$

No espectro inicial, a maior intensidade do modo em 932 cm^{-1} em relação à banda em 965 cm^{-1} indica que a coordenação inicial ocorre preferencialmente na forma *trans*, diferentemente do observado para as cit-AuNPs. Portanto para uma concentração de dto de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ há a coordenação inicial da mesma na forma *trans* e com o passar do tempo há um equilíbrio entre o complexo *trans*Dto-F e *trans*Dto-P. Porém diferentemente do caso das cit-AuNP onde o equilíbrio está deslocado para a formação do complexo *trans*Dto-P, no caso das ceto-AuNP, o equilíbrio parece estar deslocado para a formação do complexo *trans*Dto-F. A presença de tal equilíbrio a temperatura ambiente é consistente com a diferença de energia calculada para os complexos $\text{Au}_{20}\text{-transDto-P}$ e $\text{Au}_{20}\text{transDto-F}$.

Para concentração de Dto de 10^{-4} molL⁻¹, inicialmente a sua coordenação superficial também ocorre na forma *trans*. Porém com o passar do tempo observa-se que o complexo *trans*Dto-F está presente, preferencialmente, na superfície. A inexistência dos picos em 1470 e 466 cm⁻¹ indicam a ausência do complexo com a dto perpendicular à superfície.

Comparando os espectros SERS da dto na superfície das cit-AuNP, Figura 83, com os espectros na superfície das cetó-AuNP, Figura 94, observa-se uma intensificação, aproximadamente, 4 vezes maior para as cetó-AuNP. Como ambas apresentam o mesmo tamanho médio, o fator de intensificação pelo mecanismo eletromagnético deve apresentar a mesma ordem de grandeza. Portanto, as diferenças de intensidade se devem aos diferentes modos de coordenação da dto em ambas as partículas. Fazendo com que as contribuições dos mecanismos químicos sejam diferentes em cada caso.

No Capítulo 7.3.1 foram calculados os fatores de intensificação para a contribuição do mecanismo químico não ressonante ao efeito SERS, Tabela 16. Como foi discutido o maior caráter de doador e receptor π da dto no complexo Au₂₀-*trans*Dto-F leva a um fator de intensificação, cerca de 2.5 vezes maior, em relação ao fator calculado para o complexo Au₂₀-*trans*Dto-P. Sendo assim, a maior concentração do complexo *trans*Dto-F na superfície das cetó-AuNP faz com que o fator de intensificação global observado seja maior.

7.4 Conclusões

Nesse capítulo foi estudada a química de coordenação de AuNPs frente as reações de trocas de ligantes, através da análise das reações de trocas de citrato e acetoadicarboxilato pela ditiooxamida.

Com base em estudos teóricos foi mostrado que a geometria de coordenação da dto depende da labilidade dos complexos formados entre os ligantes de partida e os átomos de ouro superficiais das partículas. Além disso a concentração do ligante de entrada na esfera externa de coordenação influencia a reação de competição entre os ligantes da esfera interna e externa pelos sítios de coordenação na superfície do ouro.

Foi mostrado que o mecanismo de troca de ligante na superfície de nanopartículas de ouro passivadas com citrato pode ser aproximado por uma reação de intercâmbio, na qual ao mesmo tempo que a ligação citrato-ouro é quebrada, a ligação dto-ouro é formada. Seguida por uma reação de competição dos ligantes da camada externa, levando à dto a adquirir uma conformação perpendicular à superfície.

No caso das ceto-AuNPs não foi possível atribuir um mecanismo para a troca de ligantes, porém, mostrou-se que a dto coordena-se preferencialmente em uma conformação planar paralela à superfície das partículas. Essa geometria de coordenação leva a um maior fator de intensificação observado para o efeito SERS nas ceto-AuNPs.

Em conclusão, os resultados discutidos nesse capítulo mostram que é possível controlar a geometria de coordenação das moléculas na superfície de AuNP, variando as propriedades dos complexos superficiais precursores presentes na partícula. Uma vez que a aplicação de nanopartículas depende de uma funcionalização correta, para moléculas mais complexas esse controle da geometria de coordenação pode levar a diferentes atividades. Portanto, esse estudo pode contribuir efetivamente para o entendimento e controle das propriedades da interface partícula-molécula e consequentemente para a criação de nanopartículas funcionais mais específicas e eficientes.

8 Considerações Finais

O estudo sistemático das propriedades de nanopartículas de ouro como um todo, desde a síntese até a funcionalização das partículas, mostra que todos parâmetros experimentais de síntese estão correlacionados e suas variações levam às propriedades ópticas, químicas e físico-químicas diferentes. Dessa forma, um entendimento aprofundado do mecanismo de formação de nanopartículas é essencial para aplicá-las de maneira mais eficiente.

Os resultados apresentados no Capítulo 4, mostram que dependendo das condições experimentais, mais especificamente da concentração de citrato, o mecanismo de formação das AuNPs pode ou não seguir o mecanismo clássico proposto por LaMer. Para proporções de citrato:Au abaixo de 3:1, a formação das AuNPs não segue o mecanismo clássico, apresentando uma etapa de redução do sal de ouro e nucleação rápida. Em seguida há uma etapa de aglomeração dos núcleos formados, causada pela adsorção dos íons $[\text{AuCl}_4]^{-1}$ na superfície dos mesmos, cuja velocidade depende da concentração de citrato utilizada. Para proporções menores que 3:2, essa etapa é 2 a 3 vezes mais rápida em relação as sínteses realizadas com proporção de 3:1. O crescimento dos núcleos pode ou não ocorrer simultaneamente à aglomeração, dependendo das condições experimentais. Acredita-se que a ocorrência simultânea dessas etapas leve a um crescimento heterogêneo dos cristais, formando nanopartículas anisotrópicas. Por fim, há a desagregação e o crescimento das partículas isoladas.

Adicionalmente, pela primeira vez foi utilizada a técnica de análise de imagens em tempo real no estudo dos processos envolvidos na síntese de nanopartículas de ouro, tornando viável um estudo em tempo e condições reais de síntese, sem que seja necessária nenhuma adaptação da vidraria utilizada ou seja necessário interferir na síntese. Tal técnica tem potencial para complementar e alternar aos estudos realizados por técnicas mais sofisticadas como SAXS e XPS. Como primeira aplicação foi possível realizar um estudo qualitativo da cinética dos processos, para torná-lo quantitativo, pretende-se otimizar o sistema de forma a diminuir a reflexão da luz pelo

vidro do balão, as condições de iluminação e o tipo de detector utilizado. Além de estender o estudo para diferentes sistemas coloidais.

No Capítulo 5 foi abordada a caracterização das propriedades ópticas das AuNPs, cujas sínteses foram discutidas no Capítulo 4, principalmente pela utilização da técnica de microscopia hiperespectral de campo escuro. Corroborando os resultados já bem estabelecidos na literatura, foi mostrado que diferentes morfologias de partículas levam a propriedades ópticas diferentes. Partículas planares apresentam absorção e espalhamentos intensificados em toda região do espectro eletromagnético visível, sendo que os modos quadrupolares e dipolares de separação de carga fora do plano encontram-se na região abaixo de 400 nm, enquanto que os modos no plano, acima de 500 nm. Já para partículas esféricas foi mostrado que a largura da banda plasmônica depende da distribuição de tamanhos, da razão de aspecto e do tamanho das partículas. Para partículas maiores do que 50 nm há uma drástica diminuição da largura de banda, uma vez que o diâmetro da partícula é maior que o caminho livre médio dos elétrons. Além disso, foi mostrado que partículas que apresentam distribuições de tamanho muito próximas (cetoAuNP e citAuNP), sintetizadas partindo de condições diferentes, podem apresentar propriedades ópticas diferentes, uma vez que as cinéticas dos processos são dependentes das condições experimentais iniciais.

Esses resultados são particularmente importantes por tratar-se de uma técnica de microscopia ainda nova no Brasil. Com isso, buscou-se dar maior profundidade na parte experimental e na discussão dos resultados obtidos. Nos anexos são apresentados mais resultados, já publicados, utilizando a técnica. Com o objetivo de desenvolver a técnica e de obter estudos mais aprofundados a respeito das propriedades ópticas de nanopartículas, pretende-se estender o estudo para sistemas formados por nanopartículas anisotrópicas metálicas e ligas de diferentes composições, e para sistemas envolvendo partículas metálicas e semicondutoras.

Nos Capítulos 6 e 7 mostrou-se um estudo aprofundado da interface partícula-ligante do ponto de vista de química de coordenação. Para isso, foram estudadas, como diferentes condições

de síntese afetam a composição da camada passivante das AuNPs. Foi comprovado que presença de acetoadicarboxilato ou citrato na superfície das partículas leva a formação de complexos menos lábeis, no caso da ACDC, devido ao maior caráter de ligação covalente entre o ligante e os átomos de ouro superficiais.

O maior grau de covalência aumenta a deslocalização eletrônica, e consequentemente a polarizabilidade, contribuindo para um maior fator de intensificação do mecanismo químico fora de ressonância para o efeito SERS, no caso da ACDC. Adicionalmente, transições de transferência de carga também são favorecidas, aumentando o fator de intensificação do mecanismo CT para o efeito SERS. A combinação dos dois efeitos torna possível a observação do espectro SERS da ACDC na superfície das partículas, em condições nas quais, as partículas encontram-se isoladas, onde a contribuição do efeito eletromagnético é mínima. Sendo assim, esse é o primeiro caso reportado na literatura de um sistema coloidal onde é possível separar as contribuições dos efeitos químicos e eletromagnéticos.

As diferenças de labilidade entre a ACDC e o citrato, na superfície das AuNPs, faz com que a cinética de troca de ligante na superfície das partículas seja diferente. Utilizando a 4-mercaptopiridina como ligante de entrada, a saída da ACDC da superfície é mais rápida em relação à saída do citrato, como era esperado, devido ao menor grau de covalência do último. Contudo não foram observadas diferenças estruturais consideráveis, em relação a coordenação da 4-Mpy, e as diferenças podem ser atribuídas ao diferente valor de pH das suspensões de ambas as AuNPs.

Contudo, utilizando a ditiooxamida, como ligante de entrada, observou-se diferenças cinéticas e estruturais ao realizar a troca da ACDC ou do citrato. No caso das cit-AuNP foi possível comprovar que a Dto adquire, preferencialmente, uma conformação perpendicular à superfície da partícula, o que leva a formação de uma ligação σ entre o ouro e o enxofre. Já no caso das cit-AuNP, a Dto coordena-se, preferencialmente, em uma geometria planar à superfície, através da formação de ligações π . Este fato faz com que o fator de intensificação para o mecanismo químico

fora da ressonância seja maior para a conformação planar. Acredita-se, que para ligantes mais complexos, um controle da geometria de coordenação leve a diferentes propriedades químicas e atividades. Portanto, devem ser realizados estudos com ligantes mais complexos de forma a obter mais dados, capazes de levar à racionalização dos processos de troca de ligante que ocorrem na superfície de nanopartículas.

9 Referências

- (1) Silva, C. C.; Martins, R. de A. A “ Nova Teoria Sobre Luz E Cores” de Isaac Newton: Uma Tradução Comentada. *Rev. Bras. Ensino Física* **1996**, *18*, 313–327.
- (2) Newton, I. New Theory about Ligth and Colors. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1672**, *80*, 3075–3087.
- (3) Krapas, S.; Queiroz, G. R. P. C.; Uzêda, D. O Tratado Sobre a Luz de Huygens: Comentários. *Caderno Brasileiro de Ensino de Física*, 2011, 28.
- (4) Formação das Cores, CEPSSRM-UFRGS
<http://www.ufrgs.br/engcart/PDASR/formcor.html#2>.
- (5) Pereira, M. L. O. Estudo Da Precipitação Do Sulfato de Bário Em Níveis de Concentração Compatíveis Com a Formação de Incrustação Na Produção de Petróleo Utilizando Técnicas Analíticas Baseadas No Espalhamento de Luz, UFRJ, 2009, p. 197.
- (6) Da Silva, R. C. D. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS NO ESPALHAMENTO DE LUZ COM VISTAS À APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DE PROCESSOS DE INCRUSTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE PETRÓLEO, UFRJ, 2008, p. 124.
- (7) Faraday, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, *147*, 145–181.
- (8) Turkevich, J.; Stevenson, P.; Hillier, J. The Formation of Colloidal Gold. *J. Phys. Chem.* **1953**, *57*, 670.
- (9) Turkevich, J.; Stevenson, P.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday* **1951**, *11*, 55–75.
- (10) Choi, K. W.; Kim, D. Y.; Zhong, X.-L.; Li, Z.-Y.; Im, S. H.; Park, O. O. Robust Synthesis of Gold Rhombic Dodecahedra with Well-Controlled Sizes and Their Optical Properties. *CrystEngComm* **2013**, *15*, 252–258.
- (11) Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1957–1962.
- (12) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4065–4067.
- (13) Maier, S. A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*; Springer, Ed.; Springer: United Kingdom, 2007.
- (14) Aioub, M.; Austin, L. A.; El-Sayed, M. A. Determining Drug Efficacy Using Plasmonically Enhanced Imaging of the Morphological Changes of Cells upon Death. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 3514–3518.
- (15) Panikkanvalappil, S. R.; Hira, S. M.; Mahmoud, M. A.; El-Sayed, M. A. Unraveling the Biomolecular Snapshots of Mitosis in Healthy and Cancer Cells Using Plasmonically-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15961–15968.

- (16) Au, L.; Zheng, D. S.; Zhou, F.; Li, Z. Y.; Li, X. D.; Xia, Y. N. A Quantitative Study on the Photothermal Effect of Immuno Gold Nanocages Targeted to Breast Cancer Cells. *ACS Nano* **2008**, *2*, 1645–1652.
- (17) Xia, L.; Hu, X.; Sun, M.; Li, J.; Yang, D.; Wang, X.; Xu, H. Selective Reduction of Nitroaromatic Compounds on Silver Nanoparticles by Visible Light. *J. Raman Spectrosc.* **2012**, *43*, 1024–1028.
- (18) Gonzalez-Bejar, M.; Peters, K.; Hallett-Tapley, G. L.; Grenier, M.; Scaiano, J. C. Rapid One-Pot Propargylamine Synthesis by Plasmon Mediated Catalysis with Gold Nanoparticles on ZnO under Ambient Conditions. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1732–1734.
- (19) Scaiano, J. C.; Stampelcoskie, K. Can Surface Plasmon Fields Provide a New Way to Photosensitize Organic Photoreactions? From Designer Nanoparticles to Custom Applications. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1177–1187.
- (20) Schauermann, S.; Nilius, N.; Shaikhutdinov, S.; Freund, H.-J. Nanoparticles for Heterogeneous Catalysis: New Mechanistic Insights. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1673–1681.
- (21) Xiao, M.; Jiang, R.; Wang, F.; Fang, C.; Wang, J.; Yu, J. C. Plasmon-Enhanced Chemical Reactions. *J. Mater. Chem. A* **2013**.
- (22) Bao, Y.-S.; Baiyin, M.; Agula, B.; Jia, M.; Zhaorigetu, B. Energy-Efficient Green Catalysis, Supported Gold Nanoparticles Catalyzed Aminolysis of Ester with Inert Tertiary Amine by C-O and C-N Bond Activations. *J. Org. Chem.* **2014**.
- (23) Gatard, S.; Salmon, L.; Deraedt, C.; Ruiz, J.; Astruc, D.; Bouquillon, S. Gold Nanoparticles Stabilized by Glycodendrimers: Synthesis and Application to the Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, *2014*, 2671–2677.
- (24) Grasseschi, D.; Zamarion, V. M.; Araki, K.; Toma, H. E. Surface Enhanced Raman Scattering Spot Tests: A New Insight on Feigl's Analysis Using Gold Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9146–9149.
- (25) Zamarion, V. M.; Timm, R. A.; Araki, K.; Toma, H. E. Ultrasensitive SERS Nanoprobes for Hazardous Metal Ions Based on Trimercaptotriazine-Modified Gold Nanoparticles. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2934–2936.
- (26) Botti, S.; Almaviva, S.; Cantarini, L.; Palucci, A.; Puiu, A.; Rufoloni, A. Trace Level Detection and Identification of Nitro-Based Explosives by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, *44*, 463–468.
- (27) Liu, M.; Wang, Z.; Zong, S.; Chen, H.; Zhu, D.; Wu, L.; Hu, G.; Cui, Y. SERS Detection and Removal of Mercury(II)/Silver(I) Using Oligonucleotide-Functionalized Core/Shell Magnetic Silica Sphere@Au Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 7371–7379.
- (28) Santos, E. de B.; Lima, E. C. N. L.; Oliveira, C. S. de; Sigoli, F. A.; Mazali, I. O. Fast Detection of Paracetamol on a Gold Nanoparticle–chitosan Substrate by SERS. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 3564.

- (29) Ganbold, E.-O.; Lee, C. M.; Cho, E.-M.; Son, S. J.; Kim, S.; Joo, S.-W.; Yang, S. I. Subnanomolar Detection of Ochratoxin A Using Aptamer-Attached Silver Nanoparticles and Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 3573.
- (30) Noginov, M. A.; Zhu, G.; Belgrave, A. M.; Bakker, R.; Shalae, V. M.; Narimanov, E. E.; Stout, S.; Herz, E.; Suteewong, T.; Wiesner, U. Demonstration of a Spaser-Based Nanolaser. *Nature* **2009**, *460*, 1110–1112.
- (31) Plasmonics May Hold Key to All-Optical Chips | Research & Technology | Jun 2011 | photonics.com <http://www.photonics.com/Article.aspx?AID=47394> (accessed Jan 15, 2015).
- (32) *The Current Trends of Optics and Photonics*; Lee, C.-C., Ed.; Topics in Applied Physics; Springer Netherlands: Dordrecht, 2015; Vol. 129.
- (33) Su, Y.; Zhou, G.; Li, F.; Wang, T. High-Speed, Compact Silicon and Hybrid Plasmonic Waveguides for Signal Processing. *Front. Optoelectron. China* **2011**, *4*, 264–269.
- (34) Marani, R.; Marrocco, V.; Grande, M.; Morea, G.; D’Orazio, A.; Petruzzelli, V. Enhancement of Extraordinary Optical Transmission in a Double Heterostructure Plasmonic Bandgap Cavity. *Plasmonics* **2011**, *6*, 469–476.
- (35) Zhu, J. H.; Huang, X. G.; Mei, X. Plasmonic Electro-Optical Switches Operating at Telecom Wavelengths. *Plasmonics* **2011**, *6*, 605–612.
- (36) Deepa, K. G.; Lekha, P.; Sindhu, S. Efficiency Enhancement in DSSC Using Metal Nanoparticles: A Size Dependent Study. *Sol. Energy* **2012**, *86*, 326–330.
- (37) Qi, J.; Dang, X.; Hammond, P. T.; Belcher, A. M. Highly Efficient Plasmon-Enhanced Dye-Sensitized Solar Cells through Metal@oxide Core-Shell Nanostructure. *ACS Nano* **2011**, *5*, 7108–7116.
- (38) Qi, J.; Dang, X.; Hammond, P. T.; Belcher, A. M. Highly Efficient Plasmon-Enhanced Dye-Sensitized Solar Cells through Metal@Oxide Core–Shell Nanostructure. *ACS Nano* **2011**, *5*, 7108–7116.
- (39) Hagglund, C.; Zach, M.; Kasemo, B. Enhanced Charge Carrier Generation in Dye Sensitized Solar Cells by Nanoparticle Plasmons. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *92*.
- (40) Toma, H. E.; Zamarion, V. M.; Toma, S. H.; Araki, K. The Coordination Chemistry at Gold Nanoparticles. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1158–1176.
- (41) Morton, S. M.; Silverstein, D. W.; Jensen, L. Theoretical Studies of Plasmonics Using Electronic Structure Methods. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3962–3994.
- (42) Luo, J.; Wang, P.; Fang, Y. Direct Visual Evidence for Chemical Mechanism of SERRS of Pyrazine Adsorbed on Ag Nanoparticle via Charge Transfer. *Vib. Spectrosc.* **2014**, *70*, 162–167.
- (43) Zhao, X.; Chen, M. DFT Study on the Influence of Electric Field on Surface-Enhanced Raman Scattering from Pyridine-Metal Complex. *J. Raman Spectrosc.* **2014**, *45*, 62–67.

- (44) Shao, Y.; Li, C.; Feng, Y.; Lin, W. Surface-Enhanced Raman Scattering and Density Functional Theory Study of 1,4-Benzenedithiol and Its Silver Complexes. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *116*, 214–219.
- (45) Lang, X.-F.; Yin, P.-G.; Tan, E.-Z.; You, T.-T.; Guo, L. Theoretical Investigation on Surface-Enhanced Raman Evidence for Conformation Transition of Dimercaptoazobenzene Adsorbed on Gold Nanoclusters. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, *44*, 425–432.
- (46) Morton, S. M.; Jensen, L. A Discrete Interaction Model/quantum Mechanical Method to Describe the Interaction of Metal Nanoparticles and Molecular Absorption. *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 134103.
- (47) Moore, J. E.; Morton, S. M.; Jensen, L. Importance of Correctly Describing Charge-Transfer Excitations for Understanding the Chemical Effect in SERS. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 2470–2475.
- (48) Birke, R. L.; Znamenskiy, V.; Lombardi, J. R. A Charge-Transfer Surface Enhanced Raman Scattering Model from Time-Dependent Density Functional Theory Calculations on a Ag[₁₀]-Pyridine Complex. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 214707–214715.
- (49) Vivoni, A.; Birke, R. L.; Foucault, R.; Lombardi, J. R. Ab Initio Frequency Calculations of Pyridine Adsorbed on an Atom Model of a SERS Active Site of a Silver Surface. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5547–5557.
- (50) Sun, M.; Liu, S.; Chen, M.; Xu, H. Direct Visual Evidence for the Chemical Mechanism of Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering via Charge Transfer. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40*, 137–143.
- (51) Beloglazkina, E. K.; Majouga, A. G.; Romashkina, R. B.; Zyk, N. V.; Zefirov, N. S. Gold Nanoparticles Modified with Coordination Compounds of Metals: Synthesis and Application. *Russ. Chem. Rev.* **2012**, *81*, 65–90.
- (52) Šloufová, I.; Vlčková, B.; Procházka, M.; Svoboda, J.; Vohlídal, J. Comparison of SERRS and RRS Excitation Profiles of [Fe(tpy)₂]²⁺ (tpy = 2,2':6',2''-Terpyridine) Supported by DFT Calculations: Effect of the Electrostatic Bonding to Chloride-Modified Ag Nanoparticles on Its Vibrational and Electronic Structure. *J. Raman Spectrosc.* **2014**, *45*, 338–348.
- (53) Alvaro, M.; Aprile, C.; Ferrer, B.; Sastre, F.; García, H. Photochemistry of Gold Nanoparticles Functionalized with an iron(II) Terpyridine Complex. An Integrated Visible Light Photocatalyst for Hydrogen Generation. *Dalton Trans.* **2009**, 7437–7444.
- (54) Sheet, D.; Halder, P.; Paine, T. K. Enhanced Reactivity of a Biomimetic iron(II) A-Keto Acid Complex through Immobilization on Functionalized Gold Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 13314–13318.
- (55) Holmberg, R. J.; Hutchings, A.-J.; Habib, F.; Korobkov, I.; Scaiano, J. C.; Murugesu, M. Hybrid Nanomaterials: Anchoring Magnetic Molecules on Naked Gold Nanocrystals. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 14411–14418.

- (56) Xue, C.; Birel, O.; Li, Y.; Ma, X.; Gao, M.; Urbas, A.; Li, Q. Porphyrin Metal Complex Monolayer-Protected Gold Nanorods: A Parallel Facile Synthesis and Self-Assembly. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *398*, 1–6.
- (57) Scaiano, J. C.; Netto-Ferreira, J. C.; Alarcon, E.; Billone, P.; Alejo, C. J. B.; Crites, C.-O. L.; Decan, M.; Fasciani, C.; González-Béjar, M.; Hallett-Tapley, G.; et al. Tuning Plasmon Transitions and Their Applications in Organic Photochemistry. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 913–930.
- (58) Vainrub, A.; Pustovyy, O.; Vodyanoy, V. Resolution of 90 Nm ($\lambda/5$) in an Optical Transmission Microscope with an Annular Condenser. *Opt. Lett.* **2006**, *31*, 2855.
- (59) De Sena, R. C.; Soares, M.; Pereira, M. L. O.; da Silva, R. C. D.; do Rosário, F. F.; da Silva, J. F. C. A Simple Method Based on the Application of a CCD Camera as a Sensor to Detect Low Concentrations of Barium Sulfate in Suspension. *Sensors (Basel)*. **2011**, *11*, 864–875.
- (60) Silva, A. de P. M. da; de Oliveira, P. B.; Bandini, T. B.; Barreto Junior, A. G.; de Sena, R. C.; Silva, J. F. C. da. Low-Cost System Based on Image Analysis to Determine Solubility Curves. *Sensors Actuators B Chem.* **2013**, *177*, 1071–1074.
- (61) Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **1964**, *136*, 864.
- (62) Becke, A. D. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic Behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100.
- (63) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- (64) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. V. Systematic Optimization of Exchange-Correlation Functionals. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 8554.
- (65) Dolg, M.; Cao, X. Relativistic Pseudopotentials: Their Development and Scope of Applications. *Chem. Rev.* **2011**, *112*, 403–480.
- (66) Leite, E.; Ribeiro, C. *Crystallization and Growth of Colloidal Nanocrystals*; 2011.
- (67) LaMer, V. K.; Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monidispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4847.
- (68) Martins, M. A.; Trindade, T. Os Nanomateriais E a Descoberta de Novos Mundos Na Bancada Do Químico. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 1434–1446.
- (69) Thanh, N. T. K.; Maclean, N.; Mahiddine, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem. Rev.* **2014**, 140708135221009.
- (70) Park, J.; Joo, J.; Kwon, S. G.; Jang, Y.; Hyeon, T. Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 4630–4660.
- (71) Barnard, A. S.; Curtiss, L. A. Prediction of TiO₂ Nanoparticle Phase and Shape Transitions Controlled by Surface Chemistry. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1261–1266.

- (72) Tolbert, S. H.; Alivisatos, A. P. Size Dependence of a First Order Solid-Solid Phase Transition: The Wurtzite to Rock Salt Transformation in CdSe Nanocrystals. *Science* **1994**, *265*, 373–376.
- (73) Peng, X.; Wickham, J.; Alivisatos, A. P. Kinetics of II-VI and III-V Colloidal Semiconductor Nanocrystal Growth: “Focusing” of Size Distributions. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5343–5344.
- (74) Robb, D. T.; Privman, V. Model of Nanocrystal Formation in Solution by Burst Nucleation and Diffusional Growth. *Langmuir* **2008**, *24*, 26–35.
- (75) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of Thiol-Derivatised Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid-Liquid System. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801.
- (76) Grzelczak, M.; Perez-Juste, J.; Mulvaney, P.; Liz-Marzan, L. M. Shape Control in Gold Nanoparticle Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1783–1791.
- (77) Lohse, S. E.; Burrows, N. D.; Scarabelli, L.; Liz-Marzán, L. M.; Murphy, C. J. Anisotropic Noble Metal Nanocrystal Growth: The Role of Halides. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 34–43.
- (78) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1389–1393.
- (79) Lohse, S. E.; Murphy, C. J. The Quest for Shape Control: A History of Gold Nanorod Synthesis. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 1250–1261.
- (80) Millstone, J. E.; Hurst, S. J.; Métraux, G. S.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A. Colloidal Gold and Silver Triangular Nanoprisms. *Small* **2009**, *5*, 646–664.
- (81) Personick, M. L.; Mirkin, C. A. Making Sense of the Mayhem behind Shape Control in the Synthesis of Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18238–18247.
- (82) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
- (83) Frens, G. Controlled Nucleation for Regulation of Particle-Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature-Physical Sci.* **1973**, *241*, 20–22.
- (84) Biggs, S.; Mulvaney, P.; Zukoski, C. F.; Grieser, F. Study of Anion Adsorption at the Gold-Aqueous Solution Interface by Atomic Force Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9150–9157.
- (85) Munro, C. H.; Smith, W. E.; Garner, M.; Clarkson, J.; White, P. C. Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering. *Langmuir* **1995**, *11*, 3712–3720.
- (86) Henglein, A.; Giersig, M. Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 9533–9539.

- (87) Keating, C. D.; Musick, M. D.; Keefe, M. H.; Natan, M. J. Kinetics and Thermodynamics of Au Colloid Monolayer Self-Assembly: Undergraduate Experiments in Surface and Nanomaterials Chemistry. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 949.
- (88) Brown, K. R.; Walter, D. G.; Natan, M. J. Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 306–313.
- (89) Pei, L.; Mori, K.; Adachi, M. Formation Process of Two-Dimensional Networked Gold Nanowires by Citrate Reduction of AuCl₄⁻ and the Shape Stabilization. *Langmuir* **2004**, *20*, 7837–7843.
- (90) Alvarez-Puebla, R. a; Arceo, E.; Goulet, P. J. G.; Garrido, J. J.; Aroca, R. F. Role of Nanoparticle Surface Charge in Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3787–3792.
- (91) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, a. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15700–15707.
- (92) Wang, T.; Zheng, R.; Hu, X.; Zhang, L.; Dong, S. Templated Assembly of Gold Nanoparticles into Microscale Tubules and Their Application in Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 14179–14185.
- (93) Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13939–13948.
- (94) Kumar, S.; Gandhi, K. S.; Kumar, R. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method†. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *46*, 3128–3136.
- (95) Pong, B.-K.; Elim, H. I.; Chong, J.-X.; Ji, W.; Trout, B. L.; Lee, J.-Y. New Insights on the Nanoparticle Growth Mechanism in the Citrate Reduction of Gold(III) Salt: Formation of the Au Nanowire Intermediate and Its Nonlinear Optical Properties. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6281–6287.
- (96) Soni, V.; Sindal, R. S.; Mehrotra, R. N. Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Oxalic Acid by tetrachloroaurate(III) Ion. *Inorganica Chim. Acta* **2007**, *360*, 3141.
- (97) Patungwasa, W.; Hodak, J. H. pH Tunable Morphology of the Gold Nanoparticles Produced by Citrate Reduction. *Mater. Chem. Phys.* **2008**, *108*, 45–54.
- (98) Wu, X.; Redmond, P. L.; Liu, H.; Chen, Y.; Steigerwald, M.; Brus, L. Photovoltage Mechanism for Room Light Conversion of Citrate Stabilized Silver Nanocrystal Seeds to Large Nanoprisms. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9500.
- (99) Liu, Z.; Zu, Y.; Guo, S. Synthesis of Micron-Scale Gold Nanochains by a Modified Citrate Reduction Method. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255*, 5827.
- (100) Polte, J.; Ahner, T. T.; Delissen, F.; Sokolov, S.; Emmerling, F.; Thünemann, A. F.; Kraehnert, R. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled in Situ XANES and SAXS Evaluation. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1296–1301.

- (101) Xia, H.; Bai, S.; Hartmann, J.; Wang, D. Synthesis of Monodisperse Quasi-Spherical Gold Nanoparticles in Water via silver(I)-Assisted Citrate Reduction. *Langmuir* **2010**, *26*, 3585–3589.
- (102) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27*, 11098–11105.
- (103) Durante, N.; Fortunelli, A.; Broyer, M.; Stener, M.; Giorgieri, L. Optical Properties of Au Nanoclusters from TD-DFT Calculations. **2011**, 6277–6282.
- (104) Li, C.; Li, D.; Wan, G.; Xu, J.; Hou, W. Facile Synthesis of Concentrated Gold Nanoparticles with Low Size-Distribution in Water: Temperature and pH Controls. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 440.
- (105) Ojea-jim, I.; Bast, N. G.; Puentes, V. Influence of the Sequence of the Reagents Addition in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *2*, 15752.
- (106) Volkert, A. a; Subramaniam, V.; Haes, A. J. Implications of Citrate Concentration during the Seeded Growth Synthesis of Gold Nanoparticles. *Chem. Commun. (Camb)*. **2011**, *47*, 478.
- (107) Ojea-Jiménez, I.; Campanera, J. M. Molecular Modeling of the Reduction Mechanism in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 23682–23691.
- (108) Ojea-Jiménez, I.; Romero, F. M.; Bastús, N. G.; Puentes, V. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 1800–1804.
- (109) Schulz, F.; Homolka, T.; Bastús, N. G.; Puentes, V.; Weller, H.; Vossmeier, T. Little Adjustments Significantly Improve the Turkevich Synthesis of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2014**, *30*, 10779–10784.
- (110) Neto, B. R.; Scarminio, I. S.; Bruns, E. R. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa E Desenvolvimento Na Ciência E Na Indústria*; Editora da Unicamp, Ed.; Terceira e.; Campinas, Sp, 2007.
- (111) Mullin, J. W. *Crystallization*; Fourth edi.; London, 2001.
- (112) Grasseschi, D.; Lima, F. S.; Nakamura, M.; Toma, H. E. Hyperspectral Dark-Field Microscopy of Gold Nanodisks. *Micron* **2015**, *69*, 15–20.
- (113) Hermoso, W.; Alves, T. V.; de Oliveira, C. C. S.; Moriya, E. G.; Ornellas, F. R.; Camargo, P. H. C. Triangular Metal Nanoprisms of Ag, Au, and Cu: Modeling the Influence of Size, Composition, and Excitation Wavelength on the Optical Properties. *Chem. Phys.* **2013**, *423*, 142–150.
- (114) Hartland, G. V. Optical Studies of Dynamics in Noble Metal Nanostructures. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3858–3887.

- (115) Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1578–1586.
- (116) Lee, K. S.; El-Sayed, M. A. Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 19220–19225.
- (117) Link, S.; El-Sayed, M. A. Shape and Size Dependence of Radiative, Non-Radiative and Photothermal Properties of Gold Nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *19*, 409–453.
- (118) Link, S.; El-Sayed, M. A. Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic Nanocrystals. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2003**, *54*, 331–366.
- (119) Mie, G. Articles on the Optical Characteristics of Turbid Tubes, Especially Colloidal Metal Solutions. *Ann. Phys.* **1908**, *25*, 377–445.
- (120) Mulvaney, P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir* **1996**, *12*, 788–800.
- (121) Draine, B. T.; Flatau, P. J. Discrete-Dipole Approximation for Scattering Calculations. *J. Opt. Soc. Am. A* **1994**, *11*, 1491.
- (122) Féliidj, N.; Aubard, J.; Lévi, G. Discrete Dipole Approximation for Ultraviolet–visible Extinction Spectra Simulation of Silver and Gold Colloids. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 1195.
- (123) Dass, A. Faradaurate Nanomolecules: A Superstable Plasmonic 76.3 kDa Cluster. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19259–19261.
- (124) Kumara, C.; Dass, A. Au₃₂₉(SR)₈₄ Nanomolecules: Compositional Assignment of the 76.3 kDa Plasmonic Faradaurates. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4227–4232.
- (125) Kumara, C.; Zuo, X.; Ilavsky, J.; Chapman, K. W.; Cullen, D. A.; Dass, A. Super-Stable, Highly Monodisperse Plasmonic Faradaurate-500 Nanocrystals with 500 Gold Atoms: Au~500(SR)~120. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7410–7417.
- (126) Jensen, L.; Aikens, C. M.; Schatz, G. C. Electronic Structure Methods for Studying Surface-Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1061–1073.
- (127) Burgess, R. W.; Keast, V. J. TDDFT Study of the Optical Absorption Spectra of Bare Gold Clusters. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 3194–3201.
- (128) Link, S.; El-Sayed, M. A. Shape and Size Dependence of Radiative, Non-Radiative and Photothermal Properties of Gold Nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *19*, 409–453.
- (129) Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Coupling in Noble Metal Nanostructures. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *487*, 153–164.
- (130) Quinten, M.; Kreibig, U. Optical Properties of Aggregates of Small Metal Particles. *Surf. Sci.* **1986**, *172*, 557–577.

- (131) Halas, N. J.; Lal, S.; Chang, W.-S.; Link, S.; Nordlander, P. Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3913–3961.
- (132) Reis, E.; Sarkis, J. Identificação de Resíduos de Disparos de Armas de Fogo Por Meio Da Técnica de Espectrometria de Massas de Alta Resolução Com Fonte de Plasma Indutivo. *Química ...* **2004**, *27*, 409–413.
- (133) Nordlander, P.; Oubre, C.; Prodan, E.; Li, K.; Stockman, M. I. Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 899–903.
- (134) Hajisalem, G.; Nezami, M. S.; Gordon, R. Probing the Quantum Tunneling Limit of Plasmonic Enhancement by Third Harmonic Generation. *Nano Lett.* **2014**, *14*, 6651–6654.
- (135) Kravtsov, V.; Berweger, S.; Atkin, J. M.; Raschke, M. B. Control of Plasmon Emission and Dynamics at the Transition from Classical to Quantum Coupling. *Nano Lett.* **2014**, *14*, 5270–5275.
- (136) Cha, H.; Yoon, J. H.; Yoon, S. Probing Quantum Plasmon Coupling Using Gold Nanoparticle Dimers with Tunable Interparticle Distances down to the Subnanometer Range. *ACS Nano* **2014**, *8*, 8554–8563.
- (137) Zuloaga, J.; Prodan, E.; Nordlander, P. Quantum Description of the Plasmon Resonances of a Nanoparticle Dimer. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 887–891.
- (138) Jon, C.; C., S. G. Nanosphere Optics Lab, 2006.
- (139) Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M. Colloidal Silver Nanoplates. State of the Art and Future Challenges. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1724.
- (140) Millstone, J. E.; Park, S.; Shuford, K. L.; Qin, L.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. Observation of a Quadrupole Plasmon Mode for a Colloidal Solution of Gold Nanoprisms. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5312–5313.
- (141) Sherry, L. J.; Jin, R.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Triangular Nanoprisms. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2060–2065.
- (142) Grasseschi, D.; Parussulo, A. L. A.; Zamarion, V. M.; Guimarães, R. R.; Araki, K.; Toma, H. E. How Relevant Can the SERS Effect in Isolated Nanoparticles Be? *RSC Adv.* **2013**, *3*, 24465–24472.
- (143) Grasseschi, D.; Parussulo, A. L. A.; Zamarion, V. M.; Guimarães, R. R.; Araki, K.; Toma, H. E. SERS Studies of Isolated and Agglomerated Gold Nanoparticles Functionalized with a Dicarboxybipyridine-Trimercaptotriazine-Ruthenium Dye. *J. Raman Spectrosc.* **2014**, *45*, 758–763.
- (144) Pérez-Mirabet, L.; Surinyach, S.; Ros, J.; Suades, J.; Yáñez, R. Gold and Silver Nanoparticles Surface Functionalized with Rhenium Carbonyl Complexes. *Mater. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 439–447.

- (145) Sung, S.; Holmes, H.; Wainwright, L.; Toscani, A.; Stasiuk, G. J.; White, A. J. P.; Bell, J. D.; Wilton-Ely, J. D. E. T. Multimetallic Complexes and Functionalized Gold Nanoparticles Based on a Combination of D- and F-Elements. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 1989–2005.
- (146) Osorio-Román, I. O.; Guerrero, A. R.; Albella, P.; Aroca, R. F. Plasmon Enhanced Fluorescence with Aggregated Shell-Isolated Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10246–10251.
- (147) Jensen, L.; Schatz, G. C. Resonance Raman Scattering of Rhodamine 6G as Calculated Using Time-Dependent Density Functional Theory. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 5973–5977.
- (148) Morton, S. M.; Jensen, L. A Discrete Interaction Model/quantum Mechanical Method for Describing Response Properties of Molecules Adsorbed on Metal Nanoparticles. *J. Chem. Phys.* **2010**, *133*, 074103.
- (149) Payton, J. L.; Morton, S. M.; Moore, J. E.; Jensen, L. A Discrete Interaction Model/quantum Mechanical Method for Simulating Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 214103.
- (150) Theil, F.; Zedler, L.; März, A.; Xie, W.; Csáki, A.; Fritzsche, W.; Cialla, D.; Schmitt, M.; Popp, J.; Dietzek, B. Evidence for SERRS Enhancement in the Spectra of Ruthenium Dye–Metal Nanoparticle Conjugates. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 1121–1129.
- (151) Fu, X.; Bei, F.; Wang, X.; O'Brien, S.; Lombardi, J. Excitation Profile of Surface-Enhanced Raman Scattering in Graphene–metal Nanoparticle Based Derivatives. *Nanoscale* **2010**, 1461–1466.
- (152) Castro, J. L.; Lopez-Ramirez, M. R.; Arenas, J. F.; Otero, J. C. Surface-Enhanced Raman Scattering of Benzenesulfonamide and Sulfanilamide Adsorbed on Silver Nanoparticles. *J. Raman Spectrosc.* **2012**, *43*, 857–862.
- (153) Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G. Nanostructured Plasmonic Sensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 494–521.
- (154) Prado, E.; Daugey, N.; Plumet, S.; Servant, L.; Lecomte, S. Quantitative Label-Free RNA Detection Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7425–7427.
- (155) Zhang, L.; Li, Q. Q.; Tao, W.; Yu, B. H.; Du, Y. P. Quantitative Analysis of Thymine with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Partial Least Squares (PLS) Regression. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1827–1832.
- (156) Matschulat, A.; Drescher, D.; Kneipp, J. Surface-Enhanced Raman Scattering Hybrid Nanoprobe Multiplexing and Imaging in Biological Systems. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3259–3269.
- (157) Graham, D.; Faulds, K. Quantitative SERRS for DNA Sequence Analysis. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1042–1051.

- (158) Driskell, J. D.; Primera-Pedrozo, O. M.; Dluhy, R. A.; Zhao, Y. P.; Tripp, R. A. Quantitative Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Based Analysis of MicroRNA Mixtures. *Appl. Spectrosc.* **2009**, *63*, 1107–1114.
- (159) Hsu, P. H.; Chiang, H. H. K. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Quantitative Measurement of Lactic Acid at Physiological Concentration in Human Serum. *J. Raman Spectrosc.* **2010**, *41*, 1320–1324.
- (160) Costa, J. C. S.; Ando, R. A.; Sant'Ana, A. C.; Rossi, L. M.; Santos, P. S.; Temperini, M. L. A.; Corio, P. High Performance Gold Nanorods and Silver Nanocubes in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Pesticides. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7491–7498.
- (161) Lee, D.; Lee, S.; Seong, G. H.; Choo, J.; Lee, E. K.; Gweon, D. G. Quantitative Analysis of Methyl Parathion Pesticides in a Polydimethylsiloxane Microfluidic Channel Using Confocal Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2006**, *60*, 373–377.
- (162) Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163–166.
- (163) Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P. Surface Raman Spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic Amines Adsorbed on the Anodized Silver Electrode. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**, *84*, 1–20.
- (164) Albrecht, M. G.; Creighton, J. A. Anomalous Intense Raman-Spectra of Pyridine at a Silver Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5215–5217.
- (165) Joseph, V.; Matschulat, A.; Polte, J.; Rolf, S.; Emmerling, F.; Kneipp, J. SERS Enhancement of Gold Nanospheres of Defined Size. *J. Raman Spectrosc.* **2011**, *42*, 1736–1742.
- (166) Faulds, K.; Littleford, R. E.; Graham, D.; Dent, G.; Smith, W. E. Comparison of Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering from Unaggregated and Aggregated Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 592–598.
- (167) De Melo, V. H. S.; Zamarion, V. M.; Araki, K.; Toma, H. E. New Insights on Surface-Enhanced Raman Scattering Based on Controlled Aggregation and Spectroscopic Studies, DFT Calculations and Symmetry Analysis for 3,6-Bi-2-Pyridyl-1,2,4,5-Tetrazine Adsorbed onto Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles. *J. Raman Spectrosc.* **2011**, *42*, 644–652.
- (168) Freeman, R. G.; Bright, R. M.; Hommer, M. B.; Natan, M. J. Size Selection of Colloidal Gold Aggregates by Filtration: Effect on Surface-Enhanced Raman Scattering Intensities. *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30*, 733–738.
- (169) Schlucker, S.; Kustner, B.; Punge, A.; Bonfig, R.; Marx, A.; Strobel, P. Immuno-Raman Microspectroscopy: In Situ Detection of Antigens in Tissue Specimens by Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 719–721.
- (170) Tantra, R.; Brown, R. J. C.; Milton, M. J. T. Strategy to Improve the Reproducibility of Colloidal SERS. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38*, 1469–1479.
- (171) Bizzarri, A. R.; Cannistraro, S. SERS Detection of Thrombin by Protein Recognition Using Functionalized Gold Nanoparticles. *Nanomedicine* **2007**, *3*, 306–310.

- (172) Sánchez-Iglesias, A.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J.; Rodríguez-González, B.; García de Abajo, F. J.; Liz-Marzán, L. M. Synthesis and Optical Properties of Gold Nanodecahedra with Size Control. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2529–2534.
- (173) Gunawidjaja, R.; Peleshanko, S.; Ko, H.; Tsukruk, V. V. Bimetallic Nanocobs: Decorating Silver Nanowires with Gold Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1544 – +.
- (174) Gole, A.; Orendorff, C. J.; Murphy, C. J. Immobilization of Gold Nanorods onto Acid-Terminated Self-Assembled Monolayers via Electrostatic Interactions. *Langmuir* **2004**, *20*, 7117–7122.
- (175) Jiang, X.; Zeng, Q.; Yu, A. A Self-Seeding Coreduction Method for Shape Control of Silver Nanoplates. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 4929–4935.
- (176) Nikoobakht, B.; Wang, J.; El-Sayed, M. A. Surface-Enhanced Raman Scattering of Molecules Adsorbed on Gold Nanorods: Off-Surface Plasmon Resonance Condition. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *366*, 17–23.
- (177) Liu, J.; Lu, Y. Accelerated Color Change of Gold Nanoparticles Assembled by DNAzymes for Simple and Fast Colorimetric Pb²⁺ Detection. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12298–12305.
- (178) Yang, L.; Zhang, Y.; Ruan, W. Improved Surface-Enhanced Raman Scattering Properties of TiO₂ Nanoparticles by Zn Dopant. *J. Raman ...* **2009**, *2009*, 721–726.
- (179) Richter, A.; Lombardi, J.; Zhao, B. Size and Wavelength Dependence of the Charge-Transfer Contributions to Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Ag/PATP/ZnO Junctions. *J. Phys. ...* **2010**, 1610–1614.
- (180) Yang, L.; Jiang, X.; Ruan, W.; Zhao, B. Adsorption Study of 4-MBA on TiO₂ Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. ... *Spectrosc.* **2009**, *2009*, 2004–2008.
- (181) Yang, L.; Jiang, X.; Ruan, W.; Yang, J. Charge-Transfer-Induced Surface-Enhanced Raman Scattering on Ag-TiO₂ Nanocomposites. *J. ...* **2009**, 16226–16231.
- (182) Yang, L.; Ruan, W.; Jiang, X.; Zhao, B. Contribution of ZnO to Charge-Transfer Induced Surface-Enhanced Raman Scattering in Au/ZnO/PATP Assembly. *J. ...* **2008**, 117–120.
- (183) Yang, L.; Jiang, X.; Ruan, W.; Zhao, B. Observation of Enhanced Raman Scattering for Molecules Adsorbed on TiO₂ Nanoparticles: Charge-Transfer Contribution. *J. ...* **2008**, 20095–20098.
- (184) Livingstone, R.; Zhou, X. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Pyridine on CdSe/ZnBeSe Quantum Dots Grown by Molecular Beam Epitaxy. *J. ...* **2010**, 17460–17464.
- (185) Tian, Z.-Q.; Ren, B.; Wu, D.-Y. Surface-Enhanced Raman Scattering: From Noble to Transition Metals and from Rough Surfaces to Ordered Nanostructures. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 9463–9483.

- (186) Andiappan, M.; Christopher, P.; Linic, S. Design of Plasmonic Platforms for Selective Molecular Sensing Based on Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2012**.
- (187) Morton, S. M.; Silverstein, D. W.; Jensen, L. Theoretical Studies of Plasmonics Using Electronic Structure Methods. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3962–3994.
- (188) Long, D. A. *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering By Molecules*; John Wiley & Sons Ltd: Bradford, UK, 2002.
- (189) Sala, O. *Fundamentos de Espectroscopia Raman E No Infravermelho*; 2. ed.; Editora UNESP: São Paulo, BR, 2008.
- (190) Levine, I. N. *Molecular Spectroscopy*; 2ed. ed.; John Wiley & Sons Ltd, 1975.
- (191) Albrecht, A. C. On the Theory of Raman Intensities. *J. Chem. Phys.* **1961**, *34*, 1476–1484.
- (192) Sanchez, L.; Birke, R.; Lombardi, J. Surface-Enhanced Raman Scattering of Piperidine. The Effect of Electrode Potential on Intensity. *J. Phys. ...* **1984**, 1762–1766.
- (193) Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; Sanchez, L. A.; Bernard, I.; Sun, S. C. The Effect of Molecular Estructure on Voltage Induced Shifts of Charge Transfer Excitation in Surface Enhanced Raman Scattering. *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *104*.
- (194) Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; Lu, T.; Xu, J. Charge-Transfer Theory of Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Herzberg--Teller Contributions. *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 4174–4180.
- (195) Zhao; Jensen, L.; Schatz, G. C. Pyridine–Ag₂₀ Cluster: A Model System for Studying Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2911–2919.
- (196) Aikens, C. M.; Schatz, G. C. TDDFT Studies of Absorption and SERS Spectra of Pyridine Interacting with Au₂₀. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13317–13324.
- (197) Pan, W.-X.; Lai, Y.-C.; Wang, R.-X.; Zhang, D.-J.; Zhan, J.-H. Theoretical Elucidation of the Origin of Surface-Enhanced Raman Spectra of PCB52 Adsorbed on Silver Substrates. *J. Raman Spectrosc.* **2014**, *45*, 54–61.
- (198) Mullin, J. M.; Autschbach, J.; Schatz, G. C. Time-Dependent Density Functional Methods for Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Studies. *Comput. Theor. Chem.* **2012**, *987*, 32–41.
- (199) Lombardi, J. R.; Birke, R. L. A Unified View of Surface-Enhanced Raman Scattering. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 734–742.
- (200) Aroca, R.; RodriguezLlorente, S. Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **1997**, *408*, 17–22.
- (201) Clayden, J.; Greeves, N.; Wren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*; Oxford: New York, 2007; p. 1512.

- (202) Ojea-Jiménez, I.; Romero, F. M.; Bastús, N. G.; Puentes, V. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 1800–1804.
- (203) Sánchez-Cortés, S.; García-Ramos, J. V. Anomalous Raman Bands Appearing in Surface-Enhanced Raman Spectra. *J. Raman Spectrosc.* **1998**, *29*, 365–371.
- (204) Bell, S. E. J.; Sirimuthu, N. M. S. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Probe of Competitive Binding by Anions to Citrate-Reduced Silver Colloids. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 7405–7410.
- (205) Kerker, M.; Siiman, O.; Bumm, L. A.; Wang, D. S. Surface Enhanced Raman-Scattering (Sers) of Citrate Ion Adsorbed on Colloidal Silver. *Appl. Opt.* **1980**, *19*, 3253–3255.
- (206) Munro, C. H.; Smith, W. E.; Garner, M.; Clarkson, J.; White, P. C. Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering. *Langmuir* **1995**, *11*, 3712–3720.
- (207) Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533–3539.
- (208) Pearson, R. G. Absolute Electronegativity and Hardness Correlated with Molecular-Orbital Theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 8440–8441.
- (209) Parr, R. G.; Pearson, R. G. Absolute Hardness - Companion Parameter to Absolute Electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7512–7516.
- (210) Hudson, R. F.; Klopman, G. A General Perturbation Treatment of Chemical Reactivity. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 1103–1108.
- (211) Klopman, G. Chemical Reactivity and the Concept of Charge- and Frontier-Controlled Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 223–234.
- (212) Moskovits, M.; Suh, J. S. Surface Selection-Rules for Surface-Enhanced Raman-Spectroscopy - Calculations and Application to the Surface-Enhanced Raman-Spectrum of Phthalazine on Silver. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5526–5530.
- (213) Moskovits, M. Surface Selection-Rules. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 4408–4416.
- (214) Hallmark, V. M.; Campion, A. A Modification of the Image Dipole Selection-Rules for Surface Raman-Scattering. *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 2942–2944.
- (215) Nunes, F. S.; Bonifácio, L. D. S.; Araki, K.; Toma, H. E. Interaction of 2- and 4-Mercaptopyridine with Pentacyanoferrates and Gold Nanoparticles†. *Inorg. Chem.* **2005**, *45*, 94–101.
- (216) Yu, H. Z.; Xia, N.; Liu, Z. F. SERS Titration of 4-Mercaptopyridine Self-Assembled Monolayers at Aqueous Buffer/Gold Interfaces. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1354–1358.
- (217) Chao, Y.; Zhou, Q.; Li, Y.; Yan, Y.; Wu, Y.; Zheng, J. Potential Dependent Surface-Enhanced Raman Scattering of 4-Mercaptopyridine on Electrochemically Roughened Silver Electrodes. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 16990–16995.

- (218) Chen, L.; Fu, X.; Li, J. Ultrasensitive Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of Trypsin Based on Anti-Aggregation of 4-Mercaptopyridine-Functionalized Silver Nanoparticles: An Optical Sensing Platform toward Proteases. *Nanoscale* **2013**, *5*, 5905–5911.
- (219) Nunes, F. S.; Bonifácio, L. D. S.; Araki, K.; Toma, H. E. Interaction of 2- and 4-Mercaptopyridine with Pentacyanoferrates and Gold Nanoparticles. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 94–101.
- (220) Lou, T.; Wang, Y.; Li, J.; Peng, H.; Xiong, H.; Chen, L. Rapid Detection of Melamine with 4-Mercaptopyridine-Modified Gold Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 333–338.
- (221) Jung, H. S.; Kim, K.; Kim, M. S. Raman Spectroscopic Investigation of the Adsorption of 4-Mercaptopyridine on a Silver-Sol Surface. *J. Mol. Struct.* **1997**, *407*, 139–147.
- (222) Do, W. H.; Lee, C. J.; Kim, D. Y.; Jung, M. J. Adsorption of 2-Mercaptopyridine and 4-Mercaptopyridine on a Silver Surfaces Investigated by SERS Spectroscopy. *J. Ind. Eng. Chem.* **2012**, *18*, 2141–2146.
- (223) Hu, J.; Zhao, B.; Xu, W.; Li, B.; Fan, Y. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Study on the Structure Changes of 4-Mercaptopyridine Adsorbed on Silver Substrates and Silver Colloids. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2002**, *58*, 2827–2834.
- (224) Wang, Y.; Ruan, W.; Zhang, J. Direct Observation of Surface-Enhanced Raman Scattering in ZnO Nanocrystals. *J. Raman ...* **2009**, *2009*, 1072–1077.
- (225) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1170.
- (226) Rao, C. N. R.; Rao, C. N. R. The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications, 2 vols. (741 S.).
- (227) Azcárate, J. C.; Corthey, G.; Pensa, E.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Salvarezza, R. C.; Carro, P. Understanding the Surface Chemistry of Thiolate-Protected Metallic Nanoparticles. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 3127–3138.
- (228) Daniel, M.-C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- (229) Zhao, P.; Li, N.; Astruc, D. State of the Art in Gold Nanoparticle Synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*, 2013, *257*, 638–665.
- (230) Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. Self-Assembled Monolayers of Thiols and Dithiols on Gold: New Challenges for a Well-Known System. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1805–1834.
- (231) Luedtke, W. D.; Landman, U. Structure, Dynamics, and Thermodynamics of Passivated Gold Nanocrystallites and Their Assemblies. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13323–13329.

- (232) Guo, R.; Song, Y.; Wang, G.; Murray, R. W. Does Core Size Matter in the Kinetics of Ligand Exchanges of Monolayer-Protected Au Clusters? *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2752–2757.
- (233) Hostetler, M. J.; Templeton, A. C.; Murray, R. W. Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules. *Langmuir* **1999**, *15*, 3782–3789.
- (234) Badia, A.; Lennox, R. B.; Reven, L. A Dynamic View of Self-Assembled Monolayers. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 475–481.
- (235) Fenter, P.; Eberhardt, A.; Eisenberger, P. Self-Assembly of N-Alkyl Thiols as Disulfides on Au(111). *Science* **1994**, *266*, 1216–1218.
- (236) Andreoni, W.; Curioni, A.; Grönbeck, H. Density Functional Theory Approach to Thiols and Disulfides on Gold: Au(111) Surface and Clusters. *Int. J. Quantum Chem.* **2000**, *80*, 598–608.
- (237) Lee, J.-G.; Lee, J.; Yates, J. T. Nondissociative Chemisorption of Methanethiol on Ag(110): A Critical Result for Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 440–441.
- (238) Hasan, M.; Bethell, D.; Brust, M. The Fate of Sulfur-Bound Hydrogen on Formation of Self-Assembled Thiol Monolayers on Gold: 1 H NMR Spectroscopic Evidence from Solutions of Gold Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1132–1133.
- (239) Nuzzo, R. G.; Zegarski, B. R.; Dubois, L. H. Fundamental Studies of the Chemisorption of Organosulfur Compounds on gold(111). Implications for Molecular Self-Assembly on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 733–740.
- (240) Fenter, P.; Schreiber, F.; Berman, L.; Scoles, G.; Eisenberger, P.; Bedzyk, M. J. On the Structure and Evolution of the Buried S/Au Interface in Self-Assembled Monolayers: X-Ray Standing Wave Results. *Surf. Sci.* **1998**, *412-413*, 213–235.
- (241) Häkkinen, H. The Gold-Sulfur Interface at the Nanoscale. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 443–455.
- (242) Schreiber, F. Structure and Growth of Self-Assembling Monolayers. *Prog. Surf. Sci.* **2000**, *65*, 151–257.
- (243) Chen, S. H.; Frank, C. W. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Colloid and Interface Science*; Scheuing, D. R., Ed.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1990; Vol. 447, p. Chapter 9, pp 160–176.
- (244) Bellino, M. G.; Calvo, E. J.; Gordillo, G. Adsorption Kinetics of Charged Thiols on Gold Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 424.
- (245) Agasti, S. S.; You, C.-C.; Arumugam, P.; Rotello, V. M. Structural Control of the Monolayer Stability of Water-Soluble Gold Nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 70–73.
- (246) Donkers, R. L.; Song, Y.; Murray, R. W. Substituent Effects on the Exchange Dynamics of Ligands on 1.6 Nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2004**, *20*, 4703–4707.
- (247) Perumal, S.; Hofmann, A.; Scholz, N.; Rühl, E.; Graf, C. Kinetics Study of the Binding of Multivalent Ligands on Size-Selected Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2011**, *27*, 4456–4464.

- (248) Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Baxter, R.; Teobaldi, G.; Zerbetto, F. Kinetics of Place-Exchange Reactions of Thiols on Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2003**, *19*, 5172–5174.
- (249) Feigl, F.; Anger, V. *Spot Tests in Inorganic Analysis*; Sixth Edid.; Amsterdam, 1972.
- (250) Toma, H. E.; Takasugi, M. S. Charge-Transfer Spectra, Kinetics and Thermodynamics for Thiourea, Thioacetamide and Dithiooxamide Complexes of Pentacyanoferrate(II). *Polyhedron* **1982**, *1*, 429–436.
- (251) Desseyn, H. O.; Perlepes, S. P.; Clou, K.; Blaton, N.; Van Der Veken, B. J.; Dommisse, R.; Hansen, P. E. Theoretical, Structural, Vibrational, NMR, and Thermal Evidence of the Inter- versus Intramolecular Hydrogen Bonding in Oxamides and Thiooxamides. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 5175–5182.
- (252) Hofmans, H.; Desseyn, H. O.; Herman, M. A. The Infrared Spectra of Complexes with Planar dithiooxamides—IV. The Ni(LH₂)₂X₂ Complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 1982, *38*, 1307–1318.
- (253) Hofmans, H.; Geboes, P.; Desseyn, H. O. The Infrared Spectra of Complexes with Planar dithiooxamides—V. The Cis-Pd(LH₂)₂X₂ Complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 1986, *42*, 969–975.
- (254) Sloodmaekers, B.; Perlepes, S. P.; Desseyn, H. O. A Distinction between the S-Cis and S-Trans Conformations of Planar Dithiooxamides with Infrared Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1996, *52*, 375–377.
- (255) Klopman, G. Solvations: A Semi-Empirical Procedure for Including Solvation in Quantum Mechanical Calculations of Large Molecules. *Chem. Phys. Lett.* **1967**, *1*, 200–202.
- (256) Fasciani, C.; Alejo, C. J. B.; Grenier, M.; Netto-Ferreira, J. C.; Scaiano, J. C. High-Temperature Organic Reactions at Room Temperature Using Plasmon Excitation: Decomposition of Dicumyl Peroxide. *Org. Lett.* **2010**, *13*, 204–207.
- (257) Mortimer, R. G.; Eyring, H. Elementary Transition-State Theory of the Soret and Dufour Effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am. Sci.* **1980**, *77*, 1728–1731.

10 Apêndice

10.1 Controlador de Temperatura

Para um controle mais preciso da temperatura de síntese foi desenvolvido um sistema utilizando um microprocessador Arduino UNO, um sensor de temperatura LM35 e um sistema de rele constituído de um optoacoplador H11D1M e um transistor TRIAC TO220.

O software para o controle de temperatura foi escrito com a linguagem própria do arduino. O sistema utilizado foi um controlador de *feedback* do tipo PID, baseado nos cálculos dos erros proporcional, integral e derivativo entre a temperatura estabelecida e a medida. O software é mostrado abaixo.

```
#include <LiquidCrystal.h>

// initialize the library with the numbers of the interface pins

LiquidCrystal lcd(12, 11, 5, 4, 3, 2);

#include <PID_v1.h>

#define RelayPin 7

//Define Variables we'll be connecting to

double Setpoint, Input, Output;

//Specify the links and initial tuning parameters

PID myPID(&Input, &Output, &Setpoint,5000,10,500, DIRECT);
```

```
int WindowSize = 5000;

unsigned long windowStartTime;


int tempPot=0;

float tempSet = 0;

int tempLido = 0;

float TempA = 0;

int pinoSensor=1;

int ValorLido = 0;

float temp1=0;

float temp2=0;

float temp3=0;

float temp4=0;

float temp5=0;


void setup()

{

    pinMode (RelayPin, OUTPUT);

    pinMode (pinoSensor, INPUT);
```

```
Serial.begin(9600);
```

```
lcd.begin(16,2);
```

```
lcd.setCursor (0,0);
```

```
lcd.print ("TermoGrasseschi");
```

```
lcd.setCursor (6,1);
```

```
lcd.print ("V1.0");
```

```
delay(1000);
```

```
lcd.clear();
```

```
windowStartTime = millis();
```

```
//initialize the variables we're linked to
```

```
//tell the PID to range between 0 and the full window size
```

```
myPID.SetOutputLimits(0, WindowSize);
```

```
//turn the PID on
```

```
myPID.SetMode(AUTOMATIC);
```

```
}
```

```
void loop(){
```

```
ValorLido=analogRead (pinoSensor);
```

```
temp1 = (ValorLido * 0.00488); // 5V / 1023 = 0.00488 (precisão do A/D)
```

```
temp1 = temp1 * 100;
```

```
delay(200);
```

```
ValorLido=analogRead (pinoSensor);
```

```
temp2= (ValorLido * 0.00488);
```

```
temp2= temp2 * 100;
```

```
delay(200);
```

```
ValorLido=analogRead(pinoSensor);
```

```
temp3 = (ValorLido * 0.00488);
```

```
temp3 = temp3 * 100;
```

```
delay(200);
```

```
ValorLido=analogRead(pinoSensor);
```

```
temp4 = (ValorLido * 0.00488);
```

```
temp4 = temp4 * 100;
```

```
delay(200);
```

```
ValorLido=analogRead(pinoSensor);
```

```
temp5 = (ValorLido * 0.00488);
```

```
temp5 = temp5 * 100;
```

```
delay(189);
```

```
TempA =(temp1 + temp2 + temp3 + temp4 + temp5)/5;
```

```
tempLido = analogRead(tempPot);
```

```
tempSet = map(tempLido,0,1023,70,150);
```

```
Setpoint = tempSet;
```

```
/*ValorLido = analogRead(pinoSensor);
```

```
TempA = (ValorLido * 0.00488); // 5V / 1023 = 0.00488 (precisão do A/D)
```

```
TempA = TempA * 100;
```

```
delay(500);*/
```

```
Input = TempA;
```

```
myPID.Compute();
```

```
/******
```

```
* turn the output pin on/off based on pid output
```

```
*****/
```

```
if(millis() - windowStartTime>WindowSize)
```

```
{ //time to shift the Relay Window
```

```
    windowStartTime += WindowSize;
```

```
}
```

```
if(Output < millis() - windowStartTime) digitalWrite(RelayPin,LOW);
```

```
else digitalWrite(RelayPin,HIGH);
```

```
Serial.print("Time/TempSet/Temp/VOutStatus;");
```

```
Serial.print(millis()/1000);
```

```
Serial.print(";");
```

```
Serial.print(tempSet);
```

```
Serial.print(";");
```

```
Serial.print(TempA);
```

```
Serial.print(";");
```

```
Serial.println(Output);
```

```
lcd.setCursor (0,0);
```

```
lcd.print ("Set");
```

```
lcd.setCursor (10,0);
```

```
lcd.print(tempSet);
```

```
lcd.setCursor (0,1);
```

```
lcd.print("temp ");
```

```
lcd.setCursor (10,1);
```

```
lcd.print(TempA);
```

```
}
```

10.2 Figuras

Figura A 1: Variação dos componentes do Espectro RGB e da temperatura em função do tempo para os ensaios 9, 10, 11 e 12.

Figura A 2 Variação dos componentes do Espectro RGB e da temperatura em função do tempo para os ensaios 13, 14, 15 e 16.

Figura A 3: Imagem hiperespectral de campo escuro (A) e separação dos componentes RGB da imagem hiperespectral para as partículas sintetizadas no ensaio 02

Figura A 4 Imagem hiperespectral de campo escuro (A) e separação dos componentes RGB da imagem hiperespectral para as partículas sintetizadas no ensaio 16.

Figura A 5: Imagem hiperespectral de campo escuro (A) e separação dos componentes RGB da imagem hiperespectral para as partículas cetoAuNP

Figura A 6: Imagem hiperespectral de campo escuro (A) e separação dos componentes RGB da imagem hiperespectral para as partículas sintetizadas com 7 vezes de excesso de citrato.

Figura A 7: Espectro de espalhamento Rayleigh de bolhas de água.

Figura A 8: Curvas cinéticas para a variação de intensidade do modo normal de vibração em 732 cm⁻¹, utilizando comprimento de onda de excitação de 633 nm, para uma solução de cit-AuNP tratada com dtd (A) 10⁻³ molL⁻¹ e (B) 10⁻⁴ molL⁻¹.

Figura 9: Espectros de extinção (a) e variação da absorvância no máximo da banda de acoplamento plasmônico (b) para solução de cit-AuNP com $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes temperaturas. (A) 273 K, (B) 278 K, (C) 283 K, (D) 288 K, (E) 293 K e (F) 298 K.

11 Anexos

11.1 Dupla Camada elétrica

A fonte de estabilidade cinética dos coloides é a carga elétrica na superfície. Devido a essa carga, os íons com cargas de sinal oposto tendem a se agrupar em torno da partícula, formando uma atmosfera iônica.

Há duas regiões distintas nessa atmosfera. A primeira é uma camada de íons, quase imóvel, que adere firmemente à superfície, podendo incluir moléculas do solvente. No caso de nanopartículas de ouro sintetizada pelo método de Turkevich o citrato ou seu produto de oxidação, desprotonados, se ligam na superfície do ouro, que adquire carga negativa, e a mobilidade dessa primeira camada depende da labilidade do complexo formado.

O raio da esfera que captura essa camada mais rígida é chamado de raio de cisalhamento e é o fator principal na determinação da mobilidade das partículas. O potencial elétrico na região do raio de cisalhamento, medido em relação a um ponto distante no seio da solução, é chamado potencial zeta (ξ), ou potencial eletrocinético.

A segunda região é uma atmosfera de íons móveis atraídos eletrostaticamente e com sinal da carga oposto ao da primeira camada. As duas regiões da atmosfera iônica constituem a dupla camada elétrica.

Segundo a teoria DLVO o equilíbrio entre a interação repulsiva, das cargas da dupla camada elétrica sobre as partículas vizinhas, e a interação atrativa das forças de van Der Waals entre as partículas é responsável pela estabilidade do coloide. O potencial de repulsão é dado em função do potencial zeta, Equação Ap. 1.

$$V_{repulsão} = \frac{Aa^2\xi^2 e^{\frac{-s}{r_d}}}{R} \quad (\text{Ap.1})$$

Onde A é uma constante, a é o raio da partícula, R é a separação entre os centros de duas partículas vizinhas, s é a separação entre as superfícies de partículas vizinhas e r_d é a espessura da

dupla camada elétrica. Quando a dupla camada for delgada a espessura é dada pela Equação Ap. 2, na qual I é a força iônica do meio, ρ é a densidade da solução e b° é igual a 1 mol Kg^{-1} .

$$r_d = \left(\frac{\varepsilon RT}{2\rho F^2 I b^\circ} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Ap. 2})$$

O potencial de atração é dado pela Equação Ap. 3, na qual B é uma constante e s é a separação entre as superfícies das partículas.

$$V_{\text{atração}} = \frac{B}{s} \quad (\text{Ap. 3})$$

Quando a força iônica é elevada, a atmosfera iônica é densa, o potencial exibe um mínimo secundário em separações grandes e a espessura da camada elétrica é reduzida fazendo com os plasmons de duas partículas vizinhas se acoplem dando origem aos *hot-spots*, gerando uma banda de acoplamento plasmônico na região de 800nm, no espectro de extinção das nanopartículas. Tal acoplamento possibilita a determinação da natureza da dupla camada elétrica através do efeito SERS.

11.2 Súmula Curricular

Nome: Daniel Grasseschi**1) Formação**

Ano	Título ou atividade	Instituição
2007-2010	Graduação	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
2011-atual	Doutorado	Instituto de Química da Universidade de São Paulo

2) Histórico profissional.**Universidade de São Paulo - USP****Vínculo institucional**

2011 - Atual Vínculo: Doutorando , Enquadramento funcional: Bolsista Fapesp (Número do projeto 2011/0037-6) , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2008 - 2010 Vínculo: Aluno Graduação, Enquadramento funcional: Bolsista , Carga horária: 12, Regime: Dedicação exclusiva

3) Lista de até 10 resultados de pesquisa mais relevantes, podendo ser artigos científicos, capítulos de livros, patentes (solicitadas ou concedidas), softwares registrados ou outros tipos de publicações que considere estarem entre as 10 mais relevantes de sua carreira.

1. CERQUEIRA, MARCOS RODRIGUES FACCHINI, **Grasseschi, Daniel**, MATOS, RENATO CAMARGO, ANGNES, LUCIO

A novel functionalisation process for glucose oxidase immobilisation in poly(methyl methacrylate) microchannels in a flow system for amperometric determinations. Talanta (Oxford). , v.126, p.20 - 26, 2014.

2. **Grasseschi, Daniel**, PARUSSULO, ANDRE L. A., Zamarion, Vitor M., GUIMARÃES, ROBSON R., Araki, Koiti, Toma, Henrique E.

SERS studies of isolated and agglomerated gold nanoparticles functionalized with a dicarboxybipyridine-trimercaptotriazine-ruthenium dye. Journal of Raman Spectroscopy. , v.45, p.n/a - n/a, 2014.

3. Toma, Henrique E., **Grasseschi, Daniel**, PARUSSULO, ANDRE L.A., Zamarion, Vitor M., GUIMARÃES, ROBSON R, Araki, Koiti

How relevant can be the SERS effect in isolated nanoparticles?. RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences. , v.3, p.24465 - 24472, 2013.

4. GRASSESCHI, D., Zamarion, Vitor M., Araki, Koiti, Toma, Henrique E.

Surface Enhanced Raman Scattering Spot Tests: A New Insight on Feigl's Analysis Using Gold Nanoparticles. Analytical Chemistry (Washington). , v.82, p.9146 - 9149, 2010.

5. **GRASSESCHI, D.**, GUIMARÃES, ROBSON R, PARUSSULO, ANDRE L.A., Araki, Koiti, Toma,

Henrique E.

Gold nanoparticles functionalized with Ru-dicarboxybipyridine-trimercaptotriazine: SERS effect and application in plasmonic dye solar cells. International Journal of Nanotechnology (Online). , 2015.

6. **Grasseschi, Daniel**, LIMA, FILIPE S., NAKAMURA, MARCELO, Toma, Henrique E.

Hyperspectral Dark-Field Microscopy of Gold Nanodisks. Micron (Oxford. 1993). , 2014.

7. **GRASSESCHI, D.**, LIMA, F. S., Araki, Koiti

Processo de obtenção de nanopartículas anisotrópicas de metais nobres e nanopartículas de metais nobres, 2014. Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020140139133. Data de depósito: 09/06/2014. Depositante/Titular: Toma, Henrique E.. Depositante/Titular: Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Resumo: A presente invenção vem resolver os problemas constantes no estado da técnica por meio de um processo novo de obtenção de nanopartículas de metais nobres, o qual dispensa o uso de sementes que atuam como centro de nucleação para a formação das nanopartículas anisotrópicas. O metal nobre é selecionado do grupo que consiste de ouro, prata, platina, paládio, irídio, molibdênio ou combinações dos mesmos e as nanopartículas anisotrópicas discoidais formadas, também objeto da presente invenção, apresentam dimensões menores e razões de aspecto (raio/espessura) maiores do que aquelas preparadas pelos processos já conhecidos do estado da técnica.

8. GRASSESCHI, D., H. E. Toma

NanoSensores SERS: Ampliando os métodos de Feigl In: Prêmio Mercosul de Nanotecnologia, 2010

Nanotecnologia para o Mercosul, 2010

4) **Lista de financiamentos à pesquisa vigentes, de qualquer agência ou empresa, sob a responsabilidade do Pesquisador.**

Não se aplica

5) **Lista de orientações em andamento, com bolsas.** Não se aplica

6) **Indicadores quantitativos.**

Fonte	Número de trabalhos publicados	Citações	Índice h
Google Scholar	7	22	2

7) **Link para a página MyResearcherID (ISI) ou MyCitations (Google Scholar).**

7.a) Link para perfil no ResearcherID:

<http://www.researcherid.com/rid/O-7144-2014>

7.b) Link para MyCitations do Google Scholar

<http://scholar.google.com/citations?hl=en&user=tUOhugwAAAAJ>

8) **Outras informações**

Prêmios

2010 Prêmio Mercosul de Nanotecnologia, Ministério da Ciência e Tecnologia

2010 Qualidade em Publicação 2010, Instituto de Química da Universidade de São

Paulo

11.3 Trabalhos e Colaborações

Artigo 1

Anal. Chem. 2010, 82, 9146–9149

Letters to *Analytical Chemistry*

Surface Enhanced Raman Scattering Spot Tests: A New Insight on Feigl's Analysis Using Gold Nanoparticles

Daniel Grasseschi, Vitor M. Zamarion, Koiti Araki, and Henrique E. Toma*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Traditional Feigl's spot tests can be greatly improved with the aid of gold nanoparticles and Raman probes, by monitoring the changes in the surface enhanced Raman scattering (SERS) of the analytes directly applied on a filter paper previously impregnated with the selective organic reagent. As a proof of concept, diphenylthiocarbazone (dithizone) was treated with citrate stabilized gold nanoparticles and employed in paper spot tests for a variety of transition and heavy metal ions. Below 10^{-5} mol L⁻¹, only mercury(II) ions were able to displace the dithizone molecules from the "coordination shell" of the gold nanoparticles, leading to a systematic decay of the Raman signals. Because of the huge enhancement of the dithizone vibrational peaks, the SERS spot tests allowed the detection of picograms of Hg²⁺ ions.

Spot tests became a very popular procedure in the laboratory and in forensic chemistry since the monumental work by Fritz Feigl, encompassing inorganic and organic analyses.¹ They are usually carried out with a drop of solution applied on a filter paper impregnated with a selective or specific reagent, capable of recognizing the analytes contained in the sample. In spite of the rapid evolution of the modern analytical techniques, spot tests have remained quite useful, particularly for the quick identification of inorganic ions.

Although it is not yet a common practice, most spot tests can be coupled with suitable analytical instrumentation, such as vis–UV reflectance spectroscopy, in order to improve the evaluation of the color changes and to extract more detailed information on the nature of the chemical species. In particular, the visual limits of dilution and identification can be greatly expanded with the aid of sensitive detectors and instrumentation.

Nowadays, with the advent of nanotechnology, metal nanoparticles are introducing new interesting perspectives to be explored in chemistry, e.g., as nanocatalysts and nanomaterials, allowing a wide variety of applications.^{2–9} In particular, there is a

special class of metal nanoparticles, comprising gold, silver, and copper, which exhibit intrinsic colors associated with the occurrence of localized surface plasmon resonance (LSPR). This effect arises from the loosely bound external electrons, oscillating in resonance with the electromagnetic waves. In this way, they promote unusual light absorption and scattering response, giving rise to strong and characteristic colors for the metal nanoparticles. LSPR generates a strongly enhanced electric near-field (E_n) at the nanoparticle surface, which forms the basis of the electromagnetic surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). As a matter of fact, extremely high electric fields can occur at the surface of plasmonic metals, particularly at some discontinuity points, such as nanoholes or corrugated structures at the nanoscale. Such intense electric fields are known as "hot spots" and respond, at least in part, to the SERS effect observed for organic molecules adsorbed onto copper, gold, and silver electrodes.^{10,11}

In the case of the plasmonic nanoparticles, it has been shown that "hot spots" are naturally generated through the aggregation process which enhances the plasmon coupling interactions. As a matter of fact, theoretical studies support the conclusion that the "hot spots" are localized in the region between two interacting nanoparticles where the electric field is strongly intensified under the influence of the longitudinal plasmon resonance. Another important aspect is that the formation of metal–adsorbate species permits new excitations, such as the charge-transfer (CT) transitions from the Fermi level (E_F) to the lowest unoccupied molecular orbitals of the molecule ($E_F \rightarrow \text{LUMO}$) or from the highest occupied molecular orbital to E_F ($\text{HOMO} \rightarrow E_F$). When the excitation is in resonance with the electronic transition in the metal–adsorbate complex, the surface-enhanced Raman

* To whom correspondence should be addressed. Email: hetetoma@iq.usp.br.

(1) Feigl, F.; Anger, V. *Spot Tests in Inorganic Analysis*, 6th ed.; Elsevier: Amsterdam, 1972.

(2) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. *Chem. Soc. Rev.* 2006, 35, 209.

(3) Daniel, M. C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* 2004, 104, 293.

(4) Chon, J. W. M.; Bullen, C.; Zijlstra, P.; Gu, M. *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, 875.

(5) Chen, M. S.; Goodman, D. W. *Acc. Chem. Res.* 2006, 39, 739.

(6) Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G. *Chem. Rev.* 2008, 108, 494.

(7) Zhao, J.; Pinchuk, A. O.; McMahon, J. M.; Li, S. Z.; Ausman, L. K.; Atkinson, A. L.; Schatz, G. C. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 1710.

(8) Camden, J. P.; Dieringer, J. A.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 1653.

(9) Noguez, C.; Garzon, I. L. *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 757.

(10) Aroca, R. *Surface-enhanced vibrational spectroscopy*, John Wiley & Sons: Chichester, 2006.

(11) Ghosh, S. K.; Pal, T. *Chem. Rev.* 2007, 107, 4797.

scattering can also incorporate this type of metal–molecule charge-transfer mechanism.¹² Resonance Raman (RR) involving the electronic levels of the adsorbed molecules is also very important. This possibility is also referred as SERRS, or surface-enhanced resonance Raman scattering, and the observed spectral intensities may be quite different from those found in the original Raman spectrum of the parent molecules. Recently, a unified view of surface-enhanced Raman scattering has been presented by Lombardi and Birke¹³ in terms of the contributions of (i) the electromagnetic (EM) surface plasmon resonance in the metal nanoparticle, (ii) the charge-transfer (CT) resonance at the metal–molecule interface, and (iii) the resonances (RR) within the molecule itself. When the three resonances (EM, CT, RR) take place simultaneously, huge enhancements up to 14 orders of magnitude can be observed in the SERS spectra, allowing the expansion of the detection to the limit of a single molecule.

In addition to the SERS effect, the chemical properties of the gold nanoparticles are also quite relevant for spot test applications. Their chemistry is associated with the large percentage of surface atoms and the delocalized electrons which behave as plasmon waves. Since the coordination sites of such surface atoms are incomplete, the binding of donor–acceptor species or ligands to the gold nanoparticles is facilitated, providing a close analogy with the conventional metal complexes. As a matter of fact, the affinity of gold nanoparticles to thiol ligands reflects a great similarity with the corresponding metal ion chemistry.^{14–17} Therefore, by extending the coordination chemistry approach to gold and related nanoparticles, one can incorporate the hard and soft acid–base principles and also improve the classical Feigl spot tests, expanding considerably their detection limits by means of the SERS effect.

In this work, as a proof of concept, spherical gold nanoparticles prepared in aqueous solution by the citrate reduction method of Turkevitch et al.¹⁸ and Frens¹⁹ were employed in Feigl spot tests in the presence of diphenylthiocarbazonate or dithizone as selective organic reagent. Such citrate stabilized gold nanoparticles, cit-AuNPs, undergo rapid ligand exchange in aqueous solution and are susceptible to flocculation/aggregation processes induced by the organic ligands or by changes in the ionic strength. These aggregation processes lead to the rise of a new plasmon coupling band above 700 nm. Surprisingly, this type of behavior can also be observed on a filter paper, thus providing suitable conditions for developing what we call SERS spot tests, based on the combination of Feigl's approach and surface enhanced Raman effects.

Dithizone²⁰ (Figure 1) is a classical organic reagent for heavy metals and transition metal ions, showing rather specific responses for lead, tin, or mercury, depending on the experimental conditions

Figure 1. Structural formula of possible tautomeric forms of dithizone.

employed.^{1,21,22} The molecule admits a complex tautomeric equilibrium,^{23,24} but the NMR data²⁵ support a rather symmetric distribution of the protons, consistent with the isomer A in Figure 1. Deprotonation or metal ion coordination disrupt the symmetric configuration, yielding structures similar to the tautomeric forms (B–E), which are more likely involved in the complexation reactions. As a matter of fact, in such tautomeric forms, the sulfur and nitrogen atoms are more available for interacting with metal ions, electrodes,^{26–28} and gold nanoparticles.

Solutions of dithizone in organic solvents are strongly colored and exhibit two characteristic absorption bands at 620 and 440 nm. However, at concentrations below 10^{-5} mol L⁻¹, the methanol solutions of dithizone are practically colorless. Using an excitation wavelength of 785 nm, only a negligible Raman scattering has been observed (Figure 2). In the presence of citrate–gold nanoparticles, dithizone promotes their aggregation even at concentrations as low as 10^{-5} mol L⁻¹, giving rise of a characteristic plasmon coupling band at 700 nm. Under this condition, rather strong Raman spectra have been observed, which is coherent with the occurrence of the SERS effect for the dithizone modified gold nanoparticles, as previously observed for dithizone modified electrodes.^{23,24,26–28}

The most strongly enhanced peaks of dithizone were observed at 1588 cm⁻¹ (ν C=N + ν C–N), 1339 cm⁻¹ (ν N=N), 1305 cm⁻¹ (ν N–N + ν N–Ph), 1221 cm⁻¹ (ν N–Ph), 1164 cm⁻¹ (ν N–Ph)

- (12) Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; Lu, T.; Xu, J. *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 4174.
 (13) Lombardi, J. R.; Birke, R. L. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 734.
 (14) Toma, H. E.; Zamarion, V. M.; Toma, S. H.; Araki, K. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1158.
 (15) Nunes, F. S.; Bonifacio, I. D.; Araki, K.; Toma, H. E. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 94.
 (16) Toma, S. H.; Bonacin, J. A.; Araki, K.; Toma, H. E. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 3356.
 (17) Zamarion, V. M.; Timm, R. A.; Araki, K.; Toma, H. E. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2934.
 (18) Turkevitch, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 55.
 (19) Frens, G. *Nature, Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20.
 (20) Fischer, H. *Wiss. Veröff. Siemens-Werken* **1925**, *4*, 158.

- (21) Irving, H. M. N. H.; Nowicka-Jankowska, T. *Anal. Chim. Acta* **1971**, *54*, 55.
 (22) Nowicka-Jankowska, T.; Irving, H. M. N. H. *Anal. Chim. Acta* **1971**, *54*, 489.
 (23) Pemberton, J. E.; Buck, R. P. *J. Raman Spectrosc.* **1982**, *12*, 76.
 (24) Pemberton, J. E.; Buck, R. P. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 3336.
 (25) Irving, H. M. N. H.; Hutton, A. T. *Anal. Chim. Acta* **1982**, *141*, 311.
 (26) Pemberton, J. E.; Buck, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4076.
 (27) Pemberton, J. E.; Buck, R. P. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1355.
 (28) Pemberton, J. E.; Buck, R. P. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 248.

Figure 2. Raman spectra ($\lambda_{exc} = 785$ nm) of dithizone (Dz, 10^{-4} mol L^{-1}) in methanol (bottom line) and after treatment with an aqueous solution of cit-AuNPs (top line).

Figure 3. Illustration of dithizone anchored on gold nanoparticle. + $\delta C-H$), 998 cm^{-1} (ring breathing), and 514 cm^{-1} ($\nu C=S$). According to the tentative assignments (shown in parentheses) based on the literature,^{26–29} the enhanced Raman peaks are mainly composed by $C=S$, $N=N$, and $C-N$ vibrations, thus supporting the binding of dithizone to the gold nanoparticles via the S and/or N atoms, as shown in Figure 3.

In aqueous solution, it has been observed that the binding process requires a few minutes for completion, after which the system seems to stabilize, reaching a maximum in the absorption and Raman scattering response. At this point, however, the addition of metal ions (initial concentration = 10^{-4} mol L^{-1}) such as Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} , produced no significant change in the Raman spectra. Presumably, after the aggregation and stabilization of the dithizone–gold nanoparticles, most of the organic reagent remains trapped in the interstitial regions, and the binding and access of the metal ions, under diluted conditions, are no longer favorable. However, when the metal ions are added before the stabilization process, the Raman spectra remains sensitive, responding to their interaction with dithizone. Therefore, the kinetic aspects controlling the aggregation process should be taken into consideration in the case of SERS analytical tests in solution. Although one can perform SERS solution tests before the completion of the aggregation process, the reproducibility becomes a problem and the kinetics should be precisely controlled.

A better result was observed by mixing the cit-AuNPs with dithizone (10^{-5} mol L^{-1}) and impregnating a filter paper

Figure 4. Electronic and Raman spectra ($\lambda_{exc} = 785$ nm) of paper impregnated with 10^{-5} mol L^{-1} dithizone (bottom line) and with dithizone (10^{-5} mol L^{-1}) containing cit-AuNPs (top line).

(Watson, chromatography paper) with this suspension. To our surprise, the SERS response for this impregnated paper was very strong (Figure 4), practically masking the background matrix signals.

The observed Raman signals are similar to those recorded in aqueous colloidal solutions (Figure 2), exhibiting small changes at the 1300 cm^{-1} peak involving the $\nu(\text{Ph}-N) + \nu(\text{NN})$ vibrational peak. A Raman signal at 415 cm^{-1} also becomes apparent, suggesting the rise of an $Au-S$ stretching vibrational peak.

After drying, by applying a microdrop of the diluted ($<10^{-4}$ mol L^{-1}) metal ions solution (e.g., Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+}), only the mercury ions led to noticeable changes in the Raman spectra, as shown in Figure 5. The important aspect, in this case, is that the changes were systematic and reproducible, in contrast to those carried out in aqueous suspensions. Under similar conditions, the remaining metal ions exhibit significant decay of the SERS signals only above 10^{-4} mol L^{-1} (Figure 6).

The advantage of performing the Raman tests on paper, rather than in solution, is that the metal ion distribution is circumscribed to the spot region, preventing the large dilution which occurs when the test is performed in solution. As a matter of fact, in solution, the competitiveness of the metal ions for the organic reagent anchored at the nanoparticle surface can be greatly

(29) Michalska, D.; Kowal, A. T. *Spectrochim. Acta* **1985**, *41A*, 1119.

Figure 5. SERS response of paper impregnated with dithizone–gold nanoparticles, before and after applying 10 μL of Hg²⁺ ions ($\lambda_{exc} = 785$ nm).

reduced because of the dilution. In contrast, in the case of the paper tests, the local concentration of the metal ions tends to increase as the solvent evaporates.

The observed depletion of the Raman signals of Figure 5 is consistent with the displacement of dithizone from the gold nanoparticles, by the mercury ions. There is no evidence of direct binding of the mercury ions to the immobilized dithizone molecules at the gold nanoparticle surface. This observation explains the selectivity observed for the mercury(II) ions, since it involves a direct competition with the gold nanoparticles, following the expected trends in the stability constants. The limit of detection of the dithizone SERS spot test was close to 2 μL of Hg²⁺ 10⁻⁹ mol·L⁻¹, corresponding to 0.5 pg of mercury.

Finally, it is worth mentioning that SERS spot tests were carried out using portable fiber optics Raman equipment from Inphotonics, equipped with a frequency stabilized 300 mW, 785 diode laser. This strategy allows one to perform the measurements under local conditions, as required, for instance, in forensic analysis. Currently, a large variety of Feigl tests is being investigated in our laboratory, exploring the new perspectives of

Figure 6. SERS response of paper impregnated with dithizone–gold nanoparticles, before and after applying 10 μL of Pb²⁺ or Co²⁺ ions, 10⁻³ mol L⁻¹ ($\lambda_{exc} = 785$ nm); note that the interference from Pb²⁺ ions is negligible even at 10⁻³ mol L⁻¹ (top).

the use of gold nanoparticles and the SERS effect, for analytical purposes.

ACKNOWLEDGMENT

The support from FAPESP, CNPq, and PETROBRAS is gratefully acknowledged.

Received for review August 25, 2010. Accepted October 15, 2010.

AC102238F

How relevant can the SERS effect in isolated nanoparticles be?†

Cite this: *RSC Adv.*, 2013, **3**, 24465

Daniel Grasseschi, André L. A. Parussulo, Vitor M. Zamarion, Robson R. Guimarães, Koiti Araki and Henrique E. Toma*

Received 16th April 2013
Accepted 27th September 2013

DOI: 10.1039/c3ra41818a

www.rsc.org/advances

Gold nanoparticles electrostatically stabilized with negatively charged ruthenium complexes were individually monitored based on their characteristic plasmon bands, by means of hyperspectral dark field microscopy. Very strong SERS enhancements were observed for the isolated gold nanoparticles at exciting wavelengths in resonance with the surface plasmon band, using confocal Raman microscopy, revealing a contrasting behaviour between the agglomerated and non-agglomerated systems. The results highlighted the relevant role played by the surface enhanced resonance Raman mechanisms (SERRS) in isolated nanoparticles, more than compensating for the lack of local hot spots, in relation to the agglomerated systems.

Introduction

Nowadays, the SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) effect is important in chemistry and biology, allowing the development of very sensitive sensors capable of detecting a great variety of molecular species, including biomolecules,^{1–7} pesticides^{8,9} and hazardous metal complexes.^{10,11} Despite of the intense research activity in this field, there are still many crucial questions and controversy to be answered, particularly concerning the nature of the physico-chemical interactions contributing to the SERS effect, including the influence of the nanoparticle aggregation and the role of the adsorbed molecules in the enhancement mechanisms.

The current theoretical models for SERS are based on the electromagnetic (EM) and chemical (CM) mechanisms. The first one is centred on the intensification of local oscillating electric fields, by the coupling of the incident photons with the surface plasmons. The chemical mechanism practically extends the coupling to the adsorbed molecules, in such a way that an enhanced polarizability is attained after the binding of the molecular probes to the nanoparticles or nanostructured surfaces. For this reason, the degree of covalency and charge delocalization on the nanoparticle–molecule system has a direct influence on the SERS effect. When the molecule–nanoparticle bonding is predominantly non-covalent, the surface plasmons can perturb the electronic structure of the adsorbed molecules, causing just a slight change of polarizability. In contrast, in highly covalent systems such as those involving thiol–gold interactions, the surface binding can have a strong influence on

the molecules wave functions, and even induce charge-transfer (CT) transitions from the nanoparticles Fermi level to the molecules LUMO, or conversely, from the molecules HOMO to the nanoparticles Fermi level. These considerations have been rationalized by Lombardi and Birke^{12–14} in terms of a unified theory incorporating the three basic mechanisms: electromagnetic (EM), charge-transfer (CT) and resonance Raman (RR).

In the discussion of the SERS effect, special attention has been focused on the confluence region of the plasmonic nanoparticles, also referred as “hot spots”. In this region, the superimposition of the light induced oscillating electric fields gives rise to very strong local fields. Hot spots are widespread in nanostructured surfaces and aggregates,¹⁵ and are responsible for large SERS enhancements.¹⁶ They play the major role in the case of a purely electromagnetic mechanism. Because of their concerted influence, they exert a dramatic effect when the three mechanisms are simultaneously involved, allowing to reach the single molecule detection limit.^{17–20} For this reason, hot spots have been considered a major point in SERS studies, justifying the current research focus on nanostructured surfaces and aggregates. However, such strong emphasis on hot spots has also inhibited a very pertinent question: how relevant is the SERS effect in isolated plasmonic nanoparticles?

To the best of our knowledge, detailed studies concerning the occurrence of SERS effect in isolated nanoparticles, *i.e.*, in the absence of local hot-spots, are yet missing in the literature. In fact, this is not a trivial task, since first, one should be able to rule out any possible contribution from small amounts of agglomerates to the observed spectral intensification.^{21–24} Then, as a starting point, a good strategy is to attach electrically charged Raman probes to the gold nanoparticles, in order to promote their electrostatic stabilization and prevent the formation of agglomerates. The Raman probes should also exhibit electronic transitions in the same region of the surface

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Zip Code 26077, CEP 05513-970, São Paulo, Brazil. E-mail: henetoma@iq.usp.br

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3ra41818a

Plasmon band, in order to enhance the CT and/or RR mechanisms, and facilitate the SERS studies on isolated nanoparticles.

Results and Discussion

This approach has been successfully employed in this work, focusing on the SERS effect in the $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex ($\text{dcbpy} = 2,2'$ -bipyridine-4,4'-dicarboxylate and $\text{tmt} = 2,4,6$ -trimercapto-1,3,5-triazine), anchored on 40 nm Turkevich²⁵ gold nanoparticles. This type of complex has been specially designed in our laboratory for dye solar cells applications,²⁶ and the knowledge of the electronic and SERS effects is important for understanding its performance in hybrid photoelectrochemical devices. For this purpose, the $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{tmt})]\text{Cl}$ complex was synthesized according to the following procedure: 26 mg (0.146 mmol) of 2,4,6-trimercapto-1,3,5-triazine (Aldrich) and 100 mg (0.151 mmol) of $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ were dissolved in 25 mL of 1 : 1 water-ethanol mixture, and kept under reflux for 2 hours, in the dark.²⁷ Then, the reaction mixture was cooled and concentrated using a flash evaporator. The $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{tmt})]\text{Cl}$ product was precipitated by adding a few drops of concentrated hydrochloric acid. After collecting on a filter, the solid was washed with cold HCl solution (pH 2) and diethylether, and dried in a desiccator under vacuum.²⁶ Characterization and analysis can be seen in the ESI†

In addition to the synthetic strategy, one should also be able to monitor the individual nanoparticles and to distinguish them from the agglomerated species, *e.g.*, by directly probing the locally generated hot spots. This requirement has been fulfilled in this work, by using a CytoViva Ultra Resolution Imaging system equipped with a dark field hyperspectral arrangement mounted on an Olympus BX51 microscope. Such technique is particularly rewarding in the case of plasmonic nanoparticles, because it allows to explore the amplifying effects from the enhanced light scattering, extending the limit of resolution to detect individual nanoparticles, while discriminating them based on their characteristic plasmon bands.

As illustrated in Fig. 1, the $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex exhibits two bipyridine ligands containing carboxylate groups (required for anchoring on the TiO_2 nanocrystallites in the solar cell devices), and one trimercaptotriazine ligand displaying peripheral thiol groups for interacting with the gold nanoparticles. Its net charge can vary from +1 to -5 depending upon the extent of protonation/deprotonation of the several acid-base groups; *i.e.* four carboxylate and two thiol groups, exhibiting $\text{p}K_a = 2.9$, and 4.8, 11.5, respectively. The acidity of the two first carboxylate protons is very high, exhibiting $\text{p}K_a < 1$ (see Fig. S1 of ESI†).

In this work we focused on the -3 charged species, which predominates at pH 4. Its corresponding electronic spectrum exhibits a sharp and strong band around 300 nm, assigned to ligand internal transitions, in addition to three bands at 369 and 505 nm assigned to charge-transfer transitions from $\text{Ru}(\text{d}\pi)$ orbitals to pr^* orbitals centred on the bipyridine rings, and at 465 nm, attributed to a $\text{Ru}(\text{d}\pi) \rightarrow \text{tmtH}_2(\text{pr}^*)$ charge transfer transition. Such assignments are supported by ZINDO/S theoretical calculations (Table S1 and S2 in the ESI†), and also agree with the literature data for the related *cis*- $[\text{Ru}(\text{dcbpyH}_2)_2(\text{SCN})_2]$, *cis*- $[\text{Ru}(\text{dcbpyH}_2)_2(\text{Cl})_2]$ and *cis*- $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{NCS})_2]^{2-}$ complexes.^{27,28}

Due to the presence of thiol groups in the tmt ligand, the complex can rapidly anchor on the gold surface when mixed with the cit-AuNPs. During this process, as shown in Fig. 2, the original plasmon resonance band at 528 nm undergoes a slight increase of intensity and broadening, reflecting the interaction of the complex with the surface plasmons. A small contribution from the MLCT bands is also observed in this region. The well defined plasmon band and the base line profiles show no evidence of agglomeration. In addition, the samples were carefully analyzed by DLS using a Microtrac equipment to monitor the size distribution and scattering intensity profiles, and the results ruled out any possible occurrence of agglomeration. In agreement with this observation, the zeta potential (Zetasizer equipment) of $\text{AuNP}-[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{tmt})]^{3-}$ was

Fig. 1 Electronic spectrum (a) and structural representation (b) of $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{tmt})]^{3-}$ ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Fig. 2 Extinction spectra of aqueous suspension of original citrate-AuNP (black line) and after the binding of $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{tmt})]^{3-}$, $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (red line).

measured as -30 mV, confirming the stabilization of the nanoparticles by electrostatic repulsion.

Dark-field images of the isolated AuNP-[Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁺ particles in solution exhibited well defined bright spots, but in constant Brownian motion. For this reason, in order to record the hyperspectral images, the AuNP-[Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁺ nanoparticles were immobilized on a glass slip modified with 3-mercaptopropyltrimethoxysilane, according to the following procedure. An ultraclean NEXTERION® microscope glass slip was dipped into a solution containing 5% (v/v) of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS) in CHCl₃ for 5 minutes, and washed 5 times with ultra-pure water. Then, the mercaptosilane coated-glass was sintered at 180 °C for 2 h. After cooling at room temperature, it was further cleaned with a N₂ flux. For the nanoparticles deposition, the mercaptosilane coated glass was dipped into the solution containing ruthenium stabilized AuNPs, for 1 h, and dried under a N₂ flux.

As shown in Fig. 3, the dark-field and hyperspectral images confirmed the presence of isolated nanoparticles, which can be readily identified by their characteristic plasmon bands (Fig. 3d). A comparative SEM image (JEOL 7200) obtained for the nanoparticles deposited onto conducting ITO glass, can also be seen in Fig. 3b.

The observed plasmon resonance bands can be modelled by Mie theory^{29,30} in terms of the scattering (σ_{sca}) and absorption (σ_{abs}) cross section, according to eqn (1) and (2),

$$\sigma_{\text{sca}} = \frac{8\pi}{3} k^4 a^6 \left| \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \right|^2 \quad (1)$$

$$\sigma_{\text{abs}} = 4\pi k a^3 \text{Im} \left[\frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \right] \quad (2)$$

where ϵ and ϵ_m are the surrounding environment and AuNP dielectric constants, a is the particle radius and $k = 2\pi/\lambda$ (λ is the wavelength of the incident light). Eqn (1) and (2) indicate a

Fig. 3 Dark-field microscopy (a), SEM image (b), hyperspectral image (c) and scattering spectra (d) of a sample of non-agglomerated AuNP-[Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁺ immobilized on a MPTS functionalized glass.

resonance condition when $\epsilon = -2\epsilon_m$. Under this condition the scattering and absorption cross section reaches a maximum value, generating a characteristic plasmon peak in the scattering and extinction spectra. The smaller contribution of the absorption cross section and the greater refractive index of the glass slip is responsible for a red shift of λ_{max} in the scattering spectra, relative to extinction spectra (Fig. 2), as confirmed by the calculated AuNP spectrum (Fig. S2†).

On the other hand, the occurrence of agglomeration involving gold nanoparticles can be readily detected by the presence of the characteristic plasmon coupling band above 700 nm. This band has not been observed in our case, as shown in Fig. 3d, confirming the predominance of the isolated nanoparticles. By carrying out a more detailed examination, it is possible to find exceptional cases of adjacent nanoparticles, resembling dimers in the dark-field image. This finding, which depends upon the sample preparation mode, is actually very elucidative, as illustrated in Fig. 4.

In the hyperspectral image of two adjacent nanoparticles, one can observe the occurrence of very similar plasmon bands at both extremities (Fig. 4b and d), resembling those of the isolated particles (Fig. 4a); however, in the interparticle region a new, plasmon coupling band becomes clearly discernible (Fig. 4c). In this region, the plasmon band shifts from 595 nm to 603 nm, signaling the transversal coupling between the particles dipole momentum, while the new band at 694 nm reflects the longitudinal mode.^{15,30,31} If one maps the dark-field image (Fig. 3a) based on the spectral characteristics of the isolated and the dimer nanoparticles, it becomes clear that the majority of the particles are indeed in the isolated form (Fig. S3†).

Another important observation is that by repeating the hyperspectral microscopy experiments using citrate capped (Turkevich) gold nanoparticles in the absence of the ruthenium complex, only agglomerated nanoparticles could be detected, exhibiting the characteristic plasmon coupling band above 700 nm (Fig. S4†).

Fig. 4 Hyperspectral image (center) and individual scattering spectra (a), showing similar responses (b and d) at the extremities of the two adjacent AuNP-[Ru(dcbpy)₃](trmt)³⁺ species, and the rise of a new plasmon coupling band at 694 nm in the interparticle region (c).

Fig. 5 SERS spectra of AuNP-[Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁻ aqueous suspension at $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm, for the non-agglomerated nanoparticles (black solid curve), and after inducing agglomeration (red curve).

The Raman results obtained for the non-agglomerated AuNP-[Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁻ species, using a WITec(Alpha300R) confocal Raman microscope with Nd : YAG and He-Ne lasers, were indeed rather surprising. As shown in Fig. 5, strong Raman signals, at $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm, were produced by the isolated nanoparticles, even in the lack of hot spots in the system. It should be noticed that our previous experiments have indicated that the starting [Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁻ complex also exhibits a significant resonance Raman effect at this wavelength, since it coincides with the charge-transfer bands in this region. However, at the concentration employed in the experiments with the gold nanoparticles (2×10^{-5} mol L⁻¹), the corresponding Raman signals would be barely detectable, being negligible in comparison to the strong signals shown in Fig. 5. Therefore, the presence of the gold nanoparticles is responsible for a great enhancement of the Raman signals, by at least three orders of magnitude, in relation to the RR spectra of the free complex (Fig. S5†).

The assignment of the SERS spectra (Table 1) was carried out by comparison with the literature data for [Ru(bpy)₃]²⁺,^{32,34} Ru(dcbpy)₂(NCS)₂]²⁺,³⁵ and the tmt-AuNP SERS spectra,¹⁰ and the RR spectra for the [Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁻ complex (Fig. S6†). The Raman peaks observed in the 1470–1614 cm⁻¹ range are characteristic of the C–C and C–N stretching modes of the dcbpy ring, and their enhancement is consistent with the SERRS resonant excitation involving the Ru(d π) $\rightarrow$ dcbpy($\pi\pi^*$) charge-transfer band.^{32,36–38} The dcbpy stretching modes are enhanced due the Herzberg–Teller vibronic coupling between the electronic states involved in the MLCT transition and the dcbpy vibrational states. Additionally the modification of relative intensities of the normal modes in this region is an evidence of involvement of the chemical mechanism in the SERS effect.

The enhancement of the tmt asymmetric ring stretching at 1370 and 707 cm⁻¹ is consistent with the ligand binding to the gold surface. The electronic effects due the formation of chemical bonds with the nanoparticles surface should increase the polarizability of the adsorbed species.^{39–42} On the other hand the surface selection rules,^{43–45} favor the cases where the transition dipole moment of molecular electronic transition is oriented or have a component normal to the nanoparticle surface. In our case, the orientation of the Ru(d π) $\rightarrow$ tmtH₂($\pi\pi^*$) transition dipole moment is sensitive to the coordination mode of the tmt bridging ligand. The best orientation is achieved when the ruthenium complex is bond only through one S-atom, with the tmt ligand adopting a geometry normal to AuNP surface.

For comparison purposes, the SERS response of the AuNP–ruthenium complex system was also investigated under induced agglomerating conditions (Fig. 6). The agglomeration decreases the average interparticle distance⁴⁶ promoting the rise of the characteristic plasmon coupling band above 700 nm.^{15,30} It is well known that a colloidal nanoparticle suspension can be destabilized by addition of salts (e.g. 0.5 mmol L⁻¹), due to the increase of the ionic strength of the medium. In our case, the gold nanoparticles are so strongly stabilized by the negatively charged complex, that a relatively high concentration of NaCl (3 mmol L⁻¹) is required for inducing agglomeration. This can be seen by the rise of the

Table 1 Assignment of the SERS spectrum of the [Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁻ complex on AuNP surface

Wavenumber/cm ⁻¹	Assignment
306	Ru–N stretching
461	dcbpy CCC deformation
541	tmt ring deformation, out of plane
707	tmt asymmetric ring bending
1029	Ring breathing centered on “N” atoms of tmt + ring breathing of dcbpy
1152	tmt NCN stretching + CS deformation
1264	tmt + dcbpy CN stretching
1300	COO ⁻ stretching
1370	tmt asymmetric ring stretching
1477	dcbpy symmetric CC + CN stretching
1545	dcbpy asymmetric CC + CN stretching
1614	dcbpy symmetric CC + CN stretching

Fig. 6 Dark-field microscopy (a), SEM image (b), hyperspectral image (c) and scattering spectra of an agglomerated sample prepared with AuNP-[Ru(dcbpy)₂(trnt)]³⁺ + 3 mmol L⁻¹ NaCl, immobilized on a MPTS functionalized glass.

characteristic plasmon coupling band in the 750–900 nm range, in the scattering spectra (Fig. 6d) and extinction spectra (Fig. 7b).

The dark-field and SEM images of the agglomerated nanoparticles are shown in Fig. 6a and b. In the hyperspectral image (Fig. 6c), one can observe some details of the agglomerated nanoparticles, and it is interesting to associate them with the corresponding scattering spectra shown in Fig. 6d. As one sees in this figure, the spectra of the agglomerated nanoparticles are dominated by the plasmon coupling bands above 700 nm, with the corresponding maximum varying according to the region of the sample, thus reflecting the existence of many dispersed, non-equivalent hot spots.

It should be noted that at 532 nm, the excitation wavelength is not in resonance with the plasmon coupling band of the agglomerated system (>700 nm). For this reason, the Raman spectra (Fig. 5) of the agglomerated particles exhibited only very weak signals, practically coinciding with the base line, in comparison with the spectra of the non-agglomerated nanoparticles.

At 633 nm, the Raman signals for the non-agglomerated nanoparticles practically vanish, as shown in Fig. 7, because of the complete lack of resonance with the nanoparticle plasmon band and with the electronic bands of the complex. In contrast, the Raman spectrum of the agglomerated nanoparticles becomes significantly enhanced by the resonance with the plasmon coupling band; however, even in this case, it remained considerably weaker in relation to that observed at 532 nm for the isolated nanoparticles. Since 633 nm is far from the spectral region of the complex, it is plausible that the EM mechanism predominates the SERS spectra of the agglomerated system. However, even in this case, the observed decrease in the intensity at 1545 cm⁻¹ in relation to 1614 and 1477 cm⁻¹ bands, and disappearance of the 707 cm⁻¹ band indicate some contribution of the CT and RR mechanisms.

Finally, the differentiation between the agglomerated and non-agglomerated nanoparticles was also performed using the time resolution capability of the confocal Raman equipment, by monitoring the Raman signals at 1545 cm⁻¹ in both systems, as a function of time (Fig. 8), at $\lambda_{\text{exc}} = 633$ and 532 nm,

Fig. 7 SERS spectra of AuNP-[Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁺ aqueous suspension recorded at the excitation wavelength of 633 nm, for the non-agglomerated (black curve), and agglomerated systems (red curve) (a). Extinction spectra of AuNP-[Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁺ aqueous suspension before (black line), and after inducing aggregation (red solid line) (b).

Fig. 8 Time evolution measured for the 1545 cm⁻¹ peak intensity (integration time = 0.3 s). (a) for the agglomerated AuNP-[Ru(dcbpy)₂(tmt)]³⁺ system (+3 mmol L⁻¹ NaCl), λ_{exc} = 633 nm, and (b) for non-agglomerated species at λ_{exc} = 532 nm.

respectively. In the agglomerated condition, the presence of random aggregates exhibiting a wide distribution of hot spots, and the occurrence of Brownian motion, should introduce a dynamic fluctuation of the Raman signals probed by the confocal detector (spot size = 400 nm) using small integration times (0.3 s). This effect has been experimentally confirmed in our case, as illustrated in Fig. 8a. On the other hand, because the lack of random hot spots, the confocal Raman signals are expected to be more stable in the case of the isolated nanoparticles. This can also be seen in Fig. 8b, in agreement with our expectation.

Conclusions

In conclusion, the comparison between the Raman spectra of the agglomerated and non-agglomerated systems demonstrated

that strong SERS enhancements can also be obtained for isolated gold nanoparticles. However, in order to make it possible, the contributions of RR and/or CT intensification mechanisms should be large enough to compensate for the lack of local hot spots, in relation to the aggregated systems. Therefore, the possibility of observing strong SERS enhancements in isolated nanoparticles is quite real, and opens new exciting possibilities for exploring the molecular design and improving the chemical mechanisms, besides the current interest on the plasmonic nanostructures, for the development of more selective SERS sensors.

Acknowledgements

The financial support from FAPESP, CNPq, NAP-NN and PET-ROBRAS is gratefully acknowledged.

Notes and references

- 1 M. E. Stewart, C. R. Anderton, L. B. Thompson, J. Maria, S. K. Gray, J. A. Rogers and R. G. Nuzzo, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 494–521.
- 2 E. Prado, N. Daugey, S. Plumet, L. Servant and S. Lecomte, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7425–7427.
- 3 L. Zhang, Q. Q. Li, W. Tao, B. H. Yu and Y. P. Du, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **398**, 1827–1832.
- 4 A. Matschulat, D. Drescher and J. Kneipp, *ACS Nano*, 2010, **4**, 3259–3269.
- 5 D. Graham and K. Faulds, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 1042–1051.
- 6 J. D. Driskell, O. M. Primera-Pedrozo, R. A. Dluhy, Y. P. Zhao and R. A. Tripp, *Appl. Spectrosc.*, 2009, **63**, 1107–1114.
- 7 P. H. Hsu and H. H. K. Chiang, *J. Raman Spectrosc.*, 2010, **41**, 1320–1324.
- 8 J. C. S. Costa, R. A. Ando, A. C. Sant'Ana, L. M. Rossi, P. S. Santos, M. L. A. Temperini and P. Corio, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, **11**, 7491–7498.
- 9 D. Lee, S. Lee, G. H. Seong, J. Choo, E. K. Lee and D. G. Gweon, *Appl. Spectrosc.*, 2006, **60**, 373–377.
- 10 V. M. Zamarion, R. A. Timm, K. Araki and H. E. Toma, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 2934–2936.
- 11 D. Grasseschi, V. M. Zamarion, K. Araki and H. E. Toma, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 9146–9149.
- 12 J. R. Lombardi and R. L. Birke, 2008, 5605–5617.
- 13 J. R. Lombardi and R. L. Birke, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 734–742.
- 14 J. R. Lombardi and R. L. Birke, *J. Chem. Phys.*, 2012, **136**, 144704–144711.
- 15 N. J. Halas, S. Lal, W.-S. Chang, S. Link and P. Nordlander, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 3913–3961.
- 16 N. Pazos-Perez, C. S. Wagner, J. M. Romo-Herrera, L. M. Liz-Marzán, F. J. García de Abajo, A. Wittmann, A. Fery and R. A. Alvarez-Puebla, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 12688–12693.
- 17 A. R. Bizzarri and S. Cannistraro, *Appl. Spectrosc.*, 2002, **56**, 1531–1537.

A novel functionalisation process for glucose oxidase immobilisation in poly(methyl methacrylate) microchannels in a flow system for amperometric determinations

Marcos Rodrigues Facchini Cerqueira^{a,b}, Daniel Grasseschi^b, Renato Camargo Matos^a, Lucio Angnes^{b,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

^b Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Avenida Professor Lineu Prestes, 748, São Paulo, SP CEP 05508-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2013

Received in revised form

18 February 2014

Accepted 19 February 2014

Available online 24 March 2014

Keywords:

Poly(methyl methacrylate)

Microreactor

Glucose oxidase

Glucose

Amperometry

ABSTRACT

Different materials like glass, silicon and poly(methyl methacrylate) (PMMA) are being used to immobilise enzymes in microchannels. PMMA shows advantages such as its low price, biocompatibility and attractive mechanical and chemical properties. Despite this, the introduction of reactive functional groups on PMMA is still problematic, either because of the complex chemistry or extended reaction time involved. In this paper, a new methodology was developed to immobilise glucose oxidase (GOx) in PMMA microchannels, with the benefit of a rapid immobilisation process and a very simple route. The new procedure involves only two steps, based on the reaction of 5.0% (w/w) polyethyleneimine (PEI) with PMMA in a dimethyl sulphoxide medium, followed by the immobilisation of glucose oxidase using a solution containing 100 U enzymes and 1.0% (v/v) glutaraldehyde. The reactors prepared in this way were evaluated by a flowing system with amperometric detection (+0.60 V) based on the oxidation of the H_2O_2 produced by the reactor. The microreactor proposed here was able to work with high bioconversion and a frequency of 60 samples h^{-1} , with detection and quantification limits of 0.50 and 1.66 $\mu mol L^{-1}$, respectively. Michaelis–Menten parameters (V_{max} and K_M) were calculated as $449 \pm 47.7 nmol min^{-1}$ and $7.79 \pm 0.98 mmol$. Statistical evaluations were done to validate the proposed methodology. The content of glucose in natural and commercial coconut water samples was evaluated using the developed method. Comparison with spectrophotometric measurements showed that both methodologies have a very good correlation ($t_{calculated, 0.05, 4} = 1.35 < t_{tabled, 0.05, 4} = 2.78$).

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Microfluidic devices have received considerable attention from researchers in recent years. Since the early 1990s, when Manz et al. [1] developed the first microfluidic device, these systems have become more popular as a result of their advantages over larger scale systems. Among these, their small dimensions, large surface-to-volume ratio, well-defined reaction times and small sample quantities requirements make these systems very promising with regard to their use for analytical procedures [2–4].

In this context, the use of microchannels for enzymatic applications has also gained support. Different materials like glass [5], polystyrene [6], silicon [7,8] and poly(methyl methacrylate) (PMMA) [9], have already been used to immobilise enzymes. PMMA shows some advantages compared to other materials, such as its

low price, biocompatibility, excellent optical transparency and attractive mechanical and chemical properties [10].

The most common way to immobilise enzymes onto a micro-reactor is by using a support that can covalently attach to the enzyme or by a cross-linking agent, which can act as a spacer-arm molecule [11]. Immobilisation of enzymes provides many advantages such as their reuse, lower consumption of reagents and samples, higher analysis rate, extended lifetime and greater stability. However, for this purpose, the substrate of the reactor must have some reactive functional groups that can interact with the enzymes. A few approaches have already been made to introduce amino groups onto PMMA sheets [12–14].

Amino groups are well-known functional groups for enzyme immobilisation, but these modifications require long reaction times and/or the consumption of a large amount of reagents. The method most commonly used to add amine functionality to the surface of PMMA is a reaction with a lithiated diamine [14], but this reaction is air sensitive and the lithiated amines have limited lifetimes. In this context, Brown et al. [15] found a faster way to

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 3828; fax: +55 11 3091 3781.

E-mail address: luangnes@iq.usp.br (L. Angnes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.048>

0039-9140/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

react PMMA with NH_2 groups. In their study, an ethylenediamine solution in dimethyl sulphoxide (DMSO) solvent was used and yielded 2-fold more amino groups on PMMA surface, when compared to other methodologies. The use of different amino reactants can also enhance the number of amino groups on PMMA surface. Bai et al. [16] observed that polyethyleneimine (PEI) gave the highest number of amino groups on PMMA due to its higher density of amino groups on the polymeric surface area after modification, resulting in a greater number of binding sites. Another advantage that can be associated with the use of PEI in relation to other amino groups containing reactants is the creation of a suitable microenvironment for enzyme immobilisation, improving its stability [17].

In this work, a rapid and very efficient process for GOx immobilisation on PMMA microreactors is described. In comparison with a previous study presented by our group [9], the new process requires less time and enhances the enzymatic immobilisation rate. This is based on PMMA functionalisation with PEI (using DMSO as solvent), followed by GOx immobilisation on the microchannel walls, using glutaraldehyde as the cross-linking agent. The performance of the enzymatic reactor prepared in this way was evaluated for glucose by differential amperometric determinations.

2. Material and methods

2.1. Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade. Sodium dihydrogen phosphate, sodium hydrogen phosphate and isopropyl alcohol were purchased from Synth (Diadema, Brazil). Glutaraldehyde 25% and D-(+)-glucose were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Polyethyleneimine (MW 750,000, 50% in water), dimethyl sulphoxide and 4-aminoantipyrine were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glucose oxidase from *Aspergillus niger* (124 U mg^{-1}) was purchased from Toyobo (Osaka, Japan) and horseradish peroxidase (115 U mg^{-1}) from Seppim (Puteaux, France).

Solutions were prepared with deionised water obtained from a Milli-Q water purification system (Dubuque, IA, USA). The resistivity measured after this treatment was not less than $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. Coconut water samples were purchased from a local store. Four bottled coconut water samples, some of them extracted directly from the fruit, were evaluated.

2.2. Microchannel manufacture

Laser ablation has been widely employed to fabricate PMMA microdevices [18]. In this process, the beam of a high-energy laser

is used to break bonds in polymer molecules and remove the decomposed fragments from the ablated regions [10].

In order to engrave PMMA plates with microchannels, a CO_2 laser-engraving machine (L-Solution 100, from Gravograph Industry International La Chapelle-St Luc, France) was used. The microchannel design was made using Corel Draw 12 software (Corel Corporation-version 12.0.0.458-2003). Engravings with $500 \mu\text{m}$ width, $200 \mu\text{m}$ depth and different lengths were crafted into an $8.5 \text{ cm} \times 5.5 \text{ cm} \times 2.0 \text{ mm}$ PMMA plate. Reactors with 61.5 cm length were utilised for the majority of the measurements.

After digging the microchannel, the PMMA plate was washed with deionised water, dried, and then thermally sealed onto a 2.0 mm thick PMMA plate with the same dimensions. The sealing process was carried out using a heat press (model HT3020) operated at 110°C under 590 kPa for 30 min .

2.3. Flow system and electrochemical configuration

The main constituents of the proposed method are depicted in Fig. 1. The flow arrangement was composed of two distinct propelling systems: an aquarium pump (A) was utilised to pneumatically propel the carrier electrolyte [19], and a programmable peristaltic pump (D) (Reglo MS Digital, Ismatec), used to introduce reproducible sample volumes into the microchannel (F). Injection of samples by the peristaltic pump was performed using 0.3 mm internal diameter Tygon® tubing. A throttle (B), located between the electrolyte reservoir and the pneumatic pump, allowed control of the flow rate into the microchannels.

Electrochemical measurements were performed using a μ -Autolab type III potentiostat (EcoChemie, Netherlands) in the chronoamperometric mode. Hydrogen peroxide (H_2O_2) generated by the microreactor was detected using a three-electrode system. A commercial dual platinum electrode (G_1) was employed as working and counter-electrodes and a miniaturised $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ (G_4) was used as the reference electrode. A thin polypropylene layer ($200 \mu\text{m}$ thickness— G_2) was used as a spacer to limit the electrochemical cells bound. A PMMA cover (G_3) was used to seal the cell. This seal was fixed using four screws located at the edges of the structure. In addition, three holes were drilled on the top of the PMMA cover. Two of them were used as the input and output of the flowing solution. The connections were made with 0.3 mm i.d. Tygon® tubing. The third hole was made exactly in front of the working electrode as a way to adapt the miniaturised $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ reference electrode [20].

The arrangement depicted in Fig. 1 was explored to determine the kinetics parameters of the immobilised enzymes and to quantify glucose in coconut water samples. All samples were diluted in 0.10 mol L^{-1} phosphate buffer solution (pH 7.0) just before each analysis. Sample dilutions ranged from 1:100 to 1:2000.

Fig. 1. Configuration of the applied micro flow system: (A) one-way pneumatic propellant aquarium pump, (B) throttle, (C) electrolyte reservoir, (D) programmable peristaltic pump, (E) sample, (F) microreactor, (G) electrochemical cell, (G_1) commercial dual platinum electrode, (G_2) polypropylene layer ($200 \mu\text{m}$ thickness), (G_3) PMMA cover with holes, (G_4) miniaturised $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ electrode, (H) microcomputer and (I) waste.

2.4. Microchannel modification and characterisation

Microchannel modifications were made based on the procedure described by Brown et al. [15], except for the usage of PEI, instead of ethylenediamine, as the source of NH_2 groups.

All microchannel modifications were made after the sealing step, under flowing conditions. This procedure is advantageous, as it prevents enzymatic denaturation during the hot sealing process and additionally contributes to optimise the modification route. Flow rates of $15 \mu\text{L min}^{-1}$ and $150 \mu\text{L min}^{-1}$ were used during the modification and cleaning step, respectively. These flow rates were used to guarantee greater contact between the PMMA surface and the reactants during the modification process, and to reproduce the analysis conditions during microchannel cleaning.

To perform the microchannel modification, it was initially cleaned by flowing isopropanol for 5 min in order to remove any impurities that could be attached to the channel walls. A 5.0% (w/w) PEI solution in DMSO (a $\text{S}_{\text{N}}2$ promoting organic solvent) was then passed through the microchannel for 20 min. In sequence, the microchannel was dried under an N_2 stream and excess PEI was removed with a 0.10 mol L^{-1} phosphate buffer solution (pH 7.0), flowing for 5 min. The flow rate used here was the same as that used in the cleaning process. 5 mL of a freshly prepared mixture of GOx (100 U) and glutaraldehyde 1.0% (v/v) in phosphate buffer solution was then flowed through the microchannels for 35 min. Finally, the microchannels were washed again with phosphate buffer solution (5 min) and dried with an N_2 stream. Fig. 2 schematically shows the reactions for GOx immobilisation.

The functionalised surfaces were characterised by Raman spectroscopy measurements, performed with a WITec confocal Raman microscope model Alpha 300R equipped with Ar, Nd:YAD and He–Ne lasers. The presented spectra were acquired with the excitation laser operating at 532 nm.

2.5. Spectrophotometric measurements

In order to evaluate the precision of the proposed method, parallel spectrophotometric determination of glucose was also carried out utilising a well-established method [21], utilising a mixture of 5.0 mmol L^{-1} phenol, 0.50 mmol L^{-1} 4-aminoantipyrine, 15 U mL^{-1} GOx and 20 U mL^{-1} peroxidase, all in 0.10 mol L^{-1} phosphate buffer (pH 7.0). After dilution, solutions were kept for 1 h (at room temperature), to enable the reaction to take place. Measurements were carried out using a quartz cell with a 1.00 cm optical path at 500 nm using a spectrophotometer 600 Plus (Femto, Brazil).

3. Results and discussion

3.1. Microchannel characterisation

Fig. 3 shows a set of Raman spectra after each step in the immobilisation process. Fig. 3A shows typical Raman bands achieved for pristine PMMA [22]. PEI modification on the surface, after PMMA treatment with DMSO, can be confirmed mainly by

Fig. 3. Raman spectra of clean pristine PMMA microchannels (A) and after treatment with PEI (B) and glutaraldehyde (C).

Fig. 2. The schematic route for glucose immobilisation on PMMA microchannels.

the presence of an NH_2 bending band ($\approx 1640\text{ cm}^{-1}$) in the respective Raman spectrum (Fig. 3B). The small amount of reacted PEI on the microchannel surface leads to low intensity bands upon Raman spectroscopy and, for this reason, other bands that could be assigned to PEI were not measured. After glutaraldehyde addition, the high number of $\text{C}=\text{N}$ bonds (as indicated in Fig. 2) leads to high fluorescence after Raman excitation (Fig. 3C). Raman measurements after GOx immobilisation were ineffective since only an increase in the measured fluorescence over the previous step could be observed (spectra not shown). This increase may be caused by the highly fluorescent chromophore flavin, belonging to flavin-adenine dinucleotide (FAD), which is responsible for the redox activity of GOx [9], or to the increase in the number of $\text{C}=\text{N}$ bonds.

In order to demonstrate the effectiveness of the enzymatic immobilisation, the following experiments were done in two distinct reactors—one with immobilised GOx and another without the enzyme. The same mixture used in the colorimetric measurements, with the exception of GOx (5.0 mmol L^{-1} phenol, 0.50 mmol L^{-1} 4-aminoantipyrine, 20 U mL^{-1} peroxidase, and 0.10 mol L^{-1} phosphate buffer), in the presence of 10.0 mmol L^{-1} glucose was introduced. Fig. 4 shows the difference in the colour developed in the reactor containing immobilised GOx (Fig. 4B), by injecting the solution described above (Fig. 4A). In the reactor without immobilised enzymes, after 1 h, any colour was developed (Fig. 4C).

3.2. Flow system evaluation

The developed system was evaluated towards its application for amperometric determination of glucose. Parameters of the applied flow system such as carrier flow-rate, injected samples volumes and microchannel length were evaluated. The analytical response for the studied range of each parameter is presented in Fig. 5.

The analytical signal usually increases linearly with higher injected volumes. However, a loss in linearity is observed when the dispersion of sample in the carrier stream starts to decrease (higher injected volumes). Injected volumes ranging from $2.5\text{ }\mu\text{L}$ to $17.5\text{ }\mu\text{L}$ were evaluated, as shown in Fig. 5A. A linear increase in the current signal was observed until an injected volume of $10.0\text{ }\mu\text{L}$ was reached, while higher values showed a non-linear increase. For this reason, this sample volume ($10\text{ }\mu\text{L}$) was applied for the following measurements.

Lower flow rates (Fig. 5B) were found to give higher current signals since more glucose is converted into H_2O_2 , due to a longer residence time. However, it also affected the analytical frequency of the method, as it can be seen by the sample rate decrease ($b_1=110\text{ samples h}^{-1}$, $b_2=90\text{ samples h}^{-1}$, $b_3=70\text{ samples h}^{-1}$, and $b_4=45\text{ samples h}^{-1}$). This parameter is crucial if lower detection limits are required [23]. The flow rate adopted ($150\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$)

Fig. 4. Image of a colorimetric test made to confirm the immobilisation of GOx on the PMMA microchannel, using the solution (A) described in Section 3.1.

Fig. 5. Effect of flow parameters on amperometric response of a 0.10 mmol L^{-1} glucose standard solution: (A) injected volume (a_1 : $2.50\text{ }\mu\text{L}$, a_2 : $5.00\text{ }\mu\text{L}$, a_3 : $7.50\text{ }\mu\text{L}$, a_4 : $10.0\text{ }\mu\text{L}$, a_5 : $12.5\text{ }\mu\text{L}$, a_6 : $15.0\text{ }\mu\text{L}$ and a_7 : $17.5\text{ }\mu\text{L}$), (B) flow rate (b_1 : $\sim 300\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, b_2 : $\sim 200\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, b_3 : $\sim 150\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ and b_4 : $\sim 85\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$) and (C) microchannel length (c_1 : 13.0 cm , c_2 : 32.5 cm , c_3 : 44.5 cm and c_4 : 61.5 cm). For each experiment, conditions were fixed as follow: (A) flow rate of $\sim 200\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ and microchannel length of 61.5 cm , (B) injected volume of $10.0\text{ }\mu\text{L}$ and microchannel length of 61.5 cm and (C) injected volume of $10.0\text{ }\mu\text{L}$ and flow rate of $\sim 200\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$.

was selected considering simultaneous sensibility and analytical frequency.

Longer microchannels led to higher current signals. Despite the fact that a longer course implies higher sample dispersion, it also enables a greater number of immobilisation sites, resulting in an increase in the bioconversion rate (Fig. 5C). In the same way that it affects samples dispersion, enlarging the microchannel path also affects the analytical frequency, as sample rate is decreased ($c_1=327\text{ samples h}^{-1}$, $c_2=120\text{ samples h}^{-1}$, $c_3=100\text{ samples h}^{-1}$, and $c_4=80\text{ samples h}^{-1}$). A 61.5 cm microchannel was chosen to

achieve significant signal and also good analytical frequency. Longer channels were not evaluated, since a loss in system throughput, in relation to the rate of analysis, was not desired.

3.3. Kinetic study

Adopting the optimal values obtained above, kinetic studies were developed, aiming to evaluate the microreactor efficiency. The catalytic conversion of a substrate (S) and co-substrate (O_2), by means of an oxidase enzyme (E) with FAD as prosthetic group, to produce a product (P), can be written as [24]

The two-substrate form of the Michaelis–Menten equation for the overall reaction rate (V) is given by [24]

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + K_M(S)/[S] + K_M(O_2)/[O_2]} \quad (3)$$

where $V_{\max}$ is the maximum reaction rate of the system and K_M is defined as the concentration of substrate that gives half $V_{\max}$. Both values are known as Michaelis–Menten parameters and are a good way to determine the efficiency of enzymatic biotransformation.

However, if the co-substrate concentration is constant and higher than the substrate concentration, which is often the case, Eq. (3) can be written as [24]

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + K_M(S)/[S]} \quad (4)$$

Eq. (4) describes the rate of H_2O_2 production on the microreactor, which is lately detected on the electrode surface. As glucose standards are introduced in the microreactor, a certain amount of H_2O_2 is produced, depending on $V_{\max}$ and K_M values. The current measured after each glucose addition is proportional to the concentration of the generated H_2O_2

$$I = k[H_2O_2]_{\text{generated}} \quad (5)$$

However, when applying flow systems, the kinetics parameters of the microreactor depend directly on the applied flow rate (as it affects the contact time of the substrate and the enzyme), since it is usually much higher than the dispersion coefficient in solution. The overall reaction rate can thus be given by [25]

$$V = [H_2O_2]_{\text{generated}} \Phi \quad (6)$$

where Φ is the system flow rate. When the operating conditions are modified, either by alternating the proportion of the reactants or changing the flow rate, the conversion rate of the reactor changes [26].

As the amount of produced H_2O_2 is unknown, and since the parameters involved in “ k ” term of Eq. (5) are hard to determine, a calibration plot, ranging from $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ to 10.0 mmol L^{-1} ($I (\mu\text{A}) = 0.083(\pm 0.002) + 1.370(\pm 0.031) [H_2O_2] (\text{mmol L}^{-1})$, R^2 : 0.995), was constructed for generated H_2O_2 quantification (data not shown).

In order to determine the kinetic parameters and the linearity response range of the proposed immobilisation procedure, a glucose concentration study situated between $5.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ and 50.0 mmol L^{-1} was performed (Fig. 6A). The signals obtained demonstrated a linear response from $5.00 \mu\text{mol L}^{-1}$ to 2.00 mmol L^{-1} ($I (\mu\text{A}) = 0.006(\pm 0.003) + 0.502(\pm 0.007) [\text{Glucose}] (\text{mmol L}^{-1})$, R^2 : 0.999) (Fig. 6B).

Within the values found for the H_2O_2 produced (by means of H_2O_2 and glucose calibration plots), the reaction rate was defined as a function of the flow rate ($150 \mu\text{L min}^{-1}$). Since values higher than 10.0 mmol L^{-1} led to non-increasing current signals (Fig. 6A and B), probably due to saturation of enzyme sites, an increased competition of glucose and H_2O_2 towards the electrode active sites (since glucose standards are highly concentrated), or even because of solution viscosity enhancement, they were not considered for kinetics parameters evaluation. Fig. 7 shows the correlation of the glucose standard concentration and reaction rate.

$V_{\max}$ and K_M values were calculated by using a nonlinear least fitting square (with weighting factors) to directly fit the experimental data from Eq. (4). Values are equal to $449 \pm 47.7 \text{ nmol min}^{-1}$ ($V_{\max}$) and $7.79 \pm 0.98 \text{ mmol}$ (K_M), where K_M is in accordance with values found by random PEI/GOx immobilisation [27]. This value shows the good stability of the developed microreactor, since lower values of K_M show that the enzyme achieves its maximum catalytic efficiency at low substrate concentrations.

The activity of surface enzyme towards glucose was also evaluated by means of its efficiency. O'Neill et al. proposed a way to normalise the biosensor response with respect to H_2O_2 sensitivity, by using the slopes of the biosensor response for H_2O_2 solutions and for the H_2O_2 produced by the biosensor [24]. Slopes of both calibration plots were used to calculate the bioreactor efficiency by

$$E (\%) = \text{Slope} (S) \times 100 / \text{Slope} (H_2O_2) \quad (7)$$

Fig. 6. (A) Diagram for evaluation of the system linearity through the described range (a: $5.00 \mu\text{mol L}^{-1}$, b: $8.00 \mu\text{mol L}^{-1}$, c: $10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, d: $20.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, e: $50.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, f: $80.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, g: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, h: $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, i: $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, j: $800 \mu\text{mol L}^{-1}$, k: 1.00 mmol L^{-1} , l: 2.00 mmol L^{-1} , m: 5.00 mmol L^{-1} , n: 8.00 mmol L^{-1} , o: 10.0 mmol L^{-1} , p: 20.0 mmol L^{-1} and q: 50.0 mmol L^{-1}) and (B) linearity through the studied range in (A). Records were made using $+0.60 \text{ V}$ vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$, 0.10 mol L^{-1} phosphate buffer (pH 7.0) was used as a carrier solution. Other conditions are listed in Section 3.2.

Fig. 7. Michaelis-Menten fitting of bioreaction rate over glucose standard concentration.

Fig. 8. Analysis of glucose in coconut water. Calibration plot: (Sd₁) 10.0 μmol L⁻¹, (Sd₂) 20.0 μmol L⁻¹, (Sd₃) 40.0 μmol L⁻¹, (Sd₄) 60.0 μmol L⁻¹, and (Sd₅) 80.0 μmol L⁻¹. S₁–S₅ and S'₁–S'₅ refer to the passage of samples through the microreactor with and without immobilised GOx, respectively. Measurement conditions were the same used in Fig. 6.

A value of 36.6% of bioconversion was found, utilising the conditions adopted in this work. It is important to notice that if higher values of conversion are required, a simple decrease in the system flow rate can be implemented.

3.4. Microchannel performance towards glucose determination

Standard deviation (s.d.) of the lowest detectable standard (1 μmol L⁻¹) was applied for measuring detection (3.3 times s.d.) and quantification (10 times s.d.) limits of the method, with obtained values of 0.50 μmol L⁻¹ and 1.66 μmol L⁻¹, respectively.

To verify the repeatability of the proposed method, 105 injections of glucose (0.10 mmol L⁻¹) were performed. The analysis of this series of measurements gave an average current value of 40.1 nA and a relative standard deviation (RSD) of 3.81%. The analytical frequency obtained was 60 samples h⁻¹. To evaluate the durability of the microreactor, 1200 injections of glucose (0.10 mmol L⁻¹) were made in a single reactor, over a period of one week. During this period, the microreactor was used, washed with phosphate buffer solution, dried with an N₂ flow and stored in a refrigerator at 4 °C. After this period, the current signal decreased to about 50.0% of its initial signal. Several factors may have contributed to the decrease in signal, such as the decrease in enzyme activity.

Table 1
Result for analysis of five different coconut water samples by the proposed and spectrophotometric methods.

Samples	Amperometry		Spectrophotometry (UV-vis)	
	[Glucose] (mmol L ⁻¹)	R.S.D. (%)	[Glucose] (mmol L ⁻¹)	R.S.D. (%)
S ₁ (natural)	4.28	2.28	5.13	2.74
S ₂	96.08	2.41	93.77	1.75
S ₃	28.79	1.99	31.29	3.92
S ₄	109.43	1.35	124.68	0.38
S ₅	33.12	2.38	34.66	0.54

3.5. Quantification of glucose in coconut water samples

Coconut water samples were analysed without any pre-treatment. The samples were diluted directly in 0.10 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0) and injected into the microchannels. Fig. 8 shows the current signal of the calibration plot (ranging from 10.0 μmol L⁻¹ to 80.0 μmol L⁻¹, I (nA) = $-0.15 (\pm 0.04) + 0.53 (\pm 0.012)$ [Glucose] (μmol L⁻¹), R^2 : 0.995) obtained for glucose analysis, and also for samples after passing through a microreactor with immobilised GOx and finally the signal of samples without contact with immobilised GOx. The last group of measurements is very important to evaluate the signal from other interfering species. These last signals were subtracted from the sample signal in order to obtain the real concentration of glucose.

As shown in Fig. 8, the calibration plot was satisfactory for quantifying glucose in the analysed samples. Table 1 shows the different D-glucose concentration values of samples and their respective RSD, obtained via amperometric and spectrophotometric methods. In order to compare the results, a paired *t*-test was applied. The obtained value showed no evidence of systematic differences between the two methods ($t_{\text{calculated}}$, 0.05, 4 = 1.35 < t_{tabled} , 0.05, 4 = 2.78).

With regards to the samples' glucose concentration, it is interesting to notice that the ratio of natural to industrial coconut water varied between different brands, reaching concentrations almost 25 times higher for some industrial waters. It is known that the amount of glucose in coconut water varies with maturation and that it is also added to industrialised samples as a way to improve flavour [28,29]. In this way, the proposed methodology can be used to make a rapid investigation of coconut water adulteration.

4. Conclusion

In this study, a new fast, cheap and efficient PMMA surface modification for GOx immobilisation is presented. The developed microchannel presents good long-term stability, showing a signal reduction of 50.0% over one week of intense use. Even so, the remaining activity was sufficient for quantifications of approximately 0.10 mmol L⁻¹, merely requiring a new calibration of the reactor before its utilisation. The methodology for D-glucose determination was applied to coconut water samples, requiring only a few microlitres of each sample (10.0 μL after dilution), allied to a high sample frequency (60 samples h⁻¹) and a significant bioconversion (36.6%), allowing its use for the quality control of such samples. Moreover, this new methodology presents considerable values for Michaelis-Menten parameters, with V_{max} of 449 ± 47.7 nmol min⁻¹ and K_M of 7.79 ± 0.98 mmol. Low detection and quantification limits (0.50 μmol L⁻¹ and 1.66 μmol L⁻¹, respectively) and a wide linear range (from 5.00 μmol L⁻¹ to 2.00 mmol L⁻¹) were also found, which are useful characteristics

for quality control analysis. It is important to note that the linear working range can be modified according to operator needs, simply by changing the parameters of analysis (presented in Fig. 5).

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support from Brazilian Foundations (CAPES (Grant no. DS-32005016) and CNPq – Process 306504-2011-1), to the State Foundations (FAPESP and FAPEMIG (Grant no. APQ-00173-11)) and to the Universities sponsoring programs: NAP-NN (University of Sao Paulo (USP)) and PROPESQ (UFJF).

References

- [1] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Sens. Actuators B: Chem.* 1 (1990) 244–248.
- [2] L. Szekely, A. Guttman, *Electrophoresis* 26 (2005) 4590–4604.
- [3] D. Figgeys, D. Pinto, *Anal. Chem.* 72 (2000) 330A–335A.
- [4] J. Gao, J.D. Xu, L.E. Locascio, C.S. Lee, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2648–2655.
- [5] T. Richter, L.L. Shultz-Lockyear, R.D. Oleschuk, U. Billewsky, D.J. Harrison, *Sens. Actuators B: Chem.* 81 (2002) 369–376.
- [6] G. Dräger, C. Kiss, U. Kunz, A. Kirschning, *Org. Biomol. Chem.* 5 (2007) 3657–3664.
- [7] S. Ekström, P. Önnertjörð, J. Nilsson, M. Bengtsson, T. Laurell, G. Marko-Varga, *Anal. Chem.* 72 (2000) 286–293.
- [8] M.S. Thomsen, P. Polit, B. Nidetzky, *Chem. Commun.* 24 (2007) 2527–2529.
- [9] L.M. Cerdeira Ferreira, E.T. da Costa, C.L. do Lago, L. Angnes, *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 539–544.
- [10] Y. Chen, L.Y. Zhang, G. Chen, *Electrophoresis* 29 (2008) 1801–1814.
- [11] F. Fixe, M. Dufva, P. Telleman, C.B.V. Christensen, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1–8.
- [12] V. Bulmus, H. Ayhan, E. Pliskin, *Chem. Eng. J.* 65 (1997) 71–76.
- [13] S.A. Soper, A.C. Henry, B. Vaidya, M. Galloway, M. Wabuyele, R.L. McCarley, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 87–99.
- [14] A.C. Henry, T.J. Tutt, M. Galloway, Y.Y. Davidson, C.S. McWhorter, S.A. Soper, R.L. McCarley, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5331–5337.
- [15] L. Brown, T. Koerner, J.H. Horton, R.D. Oleschuk, *Lab Chip* 6 (2006) 66–73.
- [16] Y.L. Bai, C.G. Koh, M. Boreman, Y.J. Juang, I.C. Tang, L.J. Lee, S.T. Yang, *Langmuir* 22 (2006) 9458–9467.
- [17] J.M. Guisan, P. Sabuquillo, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, P.J. Halling, D. Kennedy, E. Miyata, D. Re, J. Mol. Catal. B: Enzym. 11 (2001) 817–824.
- [18] J.Y. Cheng, C.W. Wei, K.H. Hsu, T.H. Young, *Sens. Actuators B: Chem.* 99 (2004) 186–196.
- [19] R.C. Matos, I.G.R. Gutz, L. Angnes, R.S. Fontenele, J.J. Pedrotti, *Quim. Nova* 24 (2001) 795–798.
- [20] J.J. Pedrotti, L. Angnes, I.G.R. Gutz, *Electroanalysis* 8 (1996) 673–675.
- [21] S. Meites, K. Sanielba, *Clin. Chem.* 19 (1973) 308–311.
- [22] A. Matsushita, Y.Z. Ren, K. Matsukawa, H. Inoue, Y. Minami, I. Noda, Y. Ozaki, *Vib. Spectrosc.* 24 (2000) 171–180.
- [23] B. Karlberg, G.E. Pacey, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Elsevier, New York (1989) 6–28.
- [24] R.D. O'Neill, J.P. Lowry, G. Rocchitta, C.P. McMahon, P.A. Serra, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 78–88.
- [25] T. Laurell, J. Drott, L. Rosengren, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 289–299.
- [26] J. Lasch, R. Koelsch, *Mol. Cell. Biochem.* 2 (1973) 71–77.
- [27] W. Zhang, Y. Huang, H. Dai, X. Wang, C. Fan, G. Li, *Anal. Biochem.* 329 (2004) 85–90.
- [28] J.C. Jackson, A. Gordon, G. Wizzard, K. McCook, R. Rolle, J. Sci. Food Agric. 84 (2004) 1049–1052.
- [29] H.D.S. Oliveira, C.M.P. de Abreu, C.D. dos Santos, M.D. Cardoso, J.E.C. Teixeira, N.C.C. Guimarães, *Cienc. E Agrotecnologia* 27 (2003) 1063–1067.

G Model
JMIC2138 1–6

ARTICLE IN PRESS

Micron xxx (2014) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Micron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micron

Short communication

Hyperspectral dark-field microscopy of gold nanodisks

Daniel Grasseschi, Filipe S. Lima, Marcelo Nakamura, Henrique E. Toma*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Zip Code 26077, CEP 05513-970, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 September 2014
Received in revised form 31 October 2014
Accepted 31 October 2014
Available online xxx

Keywords:
Gold nanodisks
Dark-field microscopy
Hyperspectral microscopy
Cytoviva microscopy
SPR

ABSTRACT

The light scattering properties of hexagonal and triangular gold nanodisks were investigated by means of Cytoviva hyperspectral dark-field microscopy, exploring the huge enhancement of the scattered waves associated with the surface plasmon resonance (SPR) effect. Thanks to the high resolution capability of the dark-field microscope, the SPR effect turned it possible to probe the individual nanoparticles directly from their hyperspectral images, extrapolating the classical optical resolution limit, and providing their corresponding extinction spectra. Blue spectral shifts involving the in-plane dipolar modes were observed for the hexagonal gold nanodisks in relation to the triangular ones, allowing their spectroscopic differentiation in the dark-field images.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

When metallic nanoparticles of sub-wavelength dimensions are submitted to an oscillating electromagnetic field, coherent oscillations of the conduction band electrons can be induced, reaching a maximum at an appropriate resonance frequency. This phenomena, which generates an enhanced light scattering and absorption pattern, is known as Surface Plasmon Resonance (SPR) (Link and El-Sayed, 2003; Maier, 2007; Sardar et al., 2009). The particles size, shape and composition, and the chemical environment can have a dramatic effect on the nanoparticles optical properties by changing the charge distribution on the metallic surface (Burda et al., 2005; Jain et al., 2006; Link and El-Sayed, 2000; Millstone et al., 2009; Pastoriza-Santos and Liz-Marzán, 2008).

Small spherical nanoparticles present an isotropic charge separation on the surface, generating a single dipolar mode, while large particles generate quadrupolar modes. Nanorods can exhibit two dipolar modes associated with the charge separation along the transversal and longitudinal axes, leading to two optical extinction bands located at frequencies depending on the particle dimensions and their aspect ratio. For flat nanoparticles, such as disks or triangles, two in-plane and two out-of-plane modes can be involved, from their corresponding dipoles and quadrupoles (Millstone et al., 2009; Pastoriza-Santos and Liz-Marzán, 2008).

Each mode leads to a different enhancement of the electromagnetic field, but the effect is particularly strong for particles exhibiting sharp tips, such as triangles and stars. Those particles show a great Surface Enhancement Raman Scattering (SERS) response due the high electric field concentration on the particle's tips (Hermoso et al., 2013). In order to explore the metallic nanoparticles as optical or SERS sensors (Stewart et al., 2008) it is important to understand the single particles properties. It should be noted, however, that nanoparticles fall typically below the limit of resolution of the conventional optical microscopes ($\sim \lambda/2$).

Recent progress in dark-field microscopy has extended the optical resolution limit to $\lambda/5$ due the higher resolution power from the oblique illumination employed, coupled with a cardoid annular condenser (Vodyanov et al., 2007). The use of this technique is particularly rewarding in the case of plasmonic nanoparticles, because, in addition to a higher resolution, the enhanced light scattering propagates as a cone, generating a magnification response which allows the optical detection of the individual nanoparticles (Fan et al., 2012; Hu et al., 2008; Sherry et al., 2006). By means of the coupled spectral detector, it is possible to record the single nanoparticles scattering spectra, and to generate the corresponding hyperspectral images from the collected data.

In this work report the optical properties of hexagonal and triangular gold nanodisks of thickness and diameters in the range of 1–15 and 20–60 nm, respectively, based on hyperspectral dark-field microscopy. The scattering spectra of the individual nanoparticles are presented and discussed in terms of the resonance effect involving distinct dipole and quadrupole modes.

* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3091 3887.
E-mail address: hnetoma@iq.usp.br (H.E. Toma).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2014.10.007>
0968-4328/© 2014 Published by Elsevier Ltd.

Please cite this article in press as: Grasseschi, D., et al., Hyperspectral dark-field microscopy of gold nanodisks. Micron (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2014.10.007>

2. Materials and methods

2.1. Gold nanoparticles synthesis

Gold nanodisks (AuND) were synthesized with the following procedure: aliquots of HAuCl_4 10 mmol dm^{-3} were added to 10 mL of dodecyltrimethylammonium triflate (DTATF) 50 mmol dm^{-3} aqueous solution (45 °C) with gentle mixing, providing final concentrations of HAuCl_4 varying from 0.25 to 1 mmol dm^{-3} . The solution was maintained at this temperature for 10 min, when 60 μL of ascorbic acid (AA) 100 mmol dm^{-3} was added, changing gradually the starting yellow solution to a pink or purple color, depending on $[\text{HAuCl}_4]$.

2.2. Atomic force microscopy

The AFM samples were prepared by drop casting a gold nanoparticles suspension (diluted 100 times), on atomic flat mica (Ted Pella Inc.) and dried under vacuum. The images were recorded on a PicoSPM I microscope attached to a Molecular Imaging Picoscan 2100 controller. The topographic images were acquired by Intermittent Contact AFM technique, and using NCL-20 silicon cantilevers (Nanosensors).

2.3. Scanning electron microscopy (SEM)

After removing the excess of surfactant by centrifugation at 14,000 rpm for 3 min, the gold nanoparticles suspension was deposited on HOPG (highly ordered pyrolytic graphite), and dried under vacuum. The images were obtained using a JEOL model 7200 field emission electron microscope.

2.4. Electronic spectra

UV–vis absorption spectra were recorded on a Hewlett Packard 8453A diode-ray spectrophotometer, in the 190 to 1100 nm range, using a quartz cuvette.

2.5. Dark-field hyperspectral microscopy

A CytoViva ultra-resolution imaging system, composed by a dark-field hyperspectral arrangement mounted on an Olympus BX51 microscope, was used for recording the single particles Rayleigh scattering spectra. The dark-field configuration generates a hollow light cone focused on the specimen. Only the light scattered and diffracted inside the cone reaches the objective, which has a numerical aperture smaller than the numerical aperture of the dark-field condenser. The zero order diffracted light is not collected, and the particles appears as bright spots on a dark background. The resolution power is limited by the light diffraction. The CytoViva system uses an annular cardoid condenser (Vainrub et al., 2006) with high annular aperture that enables the collection of higher order diffracted light by the objective, increasing the resolution power up to $\lambda/5$. Fig. 1 shows an illustration of the experimental arrangement. Allied to the intensified light scattering by the plasmonic nanoparticles, this ultra-resolution optical system enables the study of a variety of nanoparticles, in wet media.

With this configuration it is possible to record a dark-field optical image composed by a three channel RGB spectra with a spatial resolution of 64 nm, and a hyperspectral image where each pixel has 64 nm and carries a full visible spectral information. For a better spectral signal to noise ratio a binning process can be performed, where four pixels are summed and a new pixel of 128 nm with an average spectra is generated. However, due the enhanced light scattering of the plasmonic nanoparticles, the full resolution hyperspectral image can be used in this case.

Fig. 1. Dark-field hyperspectral microscope scheme.

The sample was prepared by drop casting 1 μL of Au nanoparticles suspension, after diluting by half with deionized water, on a NEXTERION® ultra-clean glass B (Schott). An ultra-clean NEXTERION® glass cover slip (Schott) was put over the drop, and sealed with adhesive tape to avoid oil penetration in the sample. The dark-field optical images and the Rayleigh scattering spectra were recorded with the sample wet, in order to keep the same refraction index.

3. Theoretical background

3.1. Theory of light scattering by metallic nanoparticles

The German physicist Gustave Mie made the first theoretical treatment of the light extinction process by particles with dimensions smaller than the wavelength of the incident light (Mie, 1908). By solving the Maxwell equations for electromagnetic waves interacting with spheres, Mie derived the extinction (ext) and scattering (sca) cross section expressions shown (1) and (2), related to the multipole oscillations. The absorption (abs) cross section can be obtained by subtracting the scattering cross section from the extinction cross section (3).

$$\sigma_{\text{ext}} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \text{Re}(a_L + b_L) \quad (1)$$

$$\sigma_{\text{sca}} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) (|a_L|^2 + |b_L|^2) \quad (2)$$

$$\sigma_{\text{abs}} = \sigma_{\text{ext}} - \sigma_{\text{sca}} \quad (3)$$

In (1) and (2) k is the wave vector, a_L and b_L are composed by the particles refraction index, the refraction index of the medium and the particle radius. L refers to the excitation order, which is equal 1 for dipole excitations and 2 for quadrupoles (Fig. 2).

For nanoparticles with dimensions much smaller than the light wavelength ($2r \ll \lambda$ or $2r < \lambda/10$) only the dipolar oscillations contribute significantly for the extinction cross section (Link and El-Sayed, 2000). Thus, Eq. (1) can be simplified as shown in (4).

$$\sigma_{\text{ext}}(\omega) = 9 \frac{\omega}{c} \frac{\epsilon_m^{\frac{3}{2}} V}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \quad (4)$$

Fig. 2. Localized plasmon resonance modes for small particles (A) and for large particles (B). Extinction cross section calculated by Mie theory as a function of the particle diameter (C).

Fig. 3. (A) SEM images and (B) a typical tapping mode AFM image, with the Z profilometry scan for AuND-25.

where V is the particle volume, c the speed of the light, ϵ_m is the medium dielectric constant and $\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega)$ are the real ($\epsilon_1(\omega)$) and the imaginary ($\epsilon_2(\omega)$) parts of the particles dielectric constant ($\epsilon(\omega)$). The resonance condition is fulfilled when $\epsilon_1(\omega) = -\epsilon_m$, if $\epsilon_2(\omega)$ is relatively small. By plotting σ_{ext} as a function of the incident light wavelength one can get the plasmonic nanoparticles extinction spectra, shown in Fig. 2C.

Mie's theory is focused on spherical nanoparticles. In the case of anisotropic nanoparticles, the anisotropic contribution of the particle polarizations modes should be included. Another approach is provided by the Discrete Dipole Approximation (DDA) method, in which the nanoparticles are considered as a cubic array of electric dipoles interacting with the exciting radiation (Draine and Flatau, 1994; Féliidj et al., 1999). Each dipole is described by a polarizability (α_i) and position vector ($\mathbf{r}_i$). The polarization induced due the interaction with the incident light is given by (5), where $\mathbf{E}_{loc,i}$ is the sum of field from all the other $N-1$ dipoles (6).

$$\mathbf{P}_i = \alpha_i \mathbf{E}_{loc,i}(\mathbf{r}_i) \quad (5)$$

Fig. 4. (A) Dark-field optical image, (B) extinction spectra recorded in solution and scattering spectra of individual AuNP-25 species.

$$\mathbf{E}_{loc,i}(\mathbf{r}_i) = \mathbf{E}_0 \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_i) - \sum_{j \neq i} \mathbf{A}_j \mathbf{P}_j \quad (6)$$

In this equation, $\mathbf{k}$ is the wave vector and $\mathbf{E}_0$ is the incident light amplitude. The second term represents the interaction

Fig. 5. (A) SEM image of AuNDs, of about 50 nm, showing a lateral profile of the stacked arrangements. (B) A typical tapping mode AFM image, with the Z-profilemetry scan for AuND-50.

dipole–dipole matrix, which can be written as

$$A_{ij}P_j = \frac{\exp(ikr_{ij})}{r_{ij}^3} \left(k^2 r_{ij} \times (r_{ij} \times P_j) + \frac{1 - ikr_{ij}}{r_{ij}^2} \times [r_{ij}^2 P_j - 3r_{ij}(r_{ij} \cdot P_j)] \right) \quad (7)$$

$j = 1, 2, \dots, N, j \neq i$

where r_{ij} and r_{ij} are the dipole–dipole relative position vector and modulus, respectively. Eq. (7) provides a system with $3N$ complex linear equations, which can be solved for P_j . From this value, the extinction and absorption cross sections can be calculated, using Eqs. (8) and (9).

$$\sigma_{ext} = \frac{4\pi k}{|E_0|^2} \sum_{i=1}^N \text{Im}(E_{loc,i}^* \cdot P_i) \quad (8)$$

$$\sigma_{abs} = \frac{4\pi k}{|E_0|^2} \sum_{i=1}^N \left(\text{Im}[P_i \cdot (\alpha_i^{-1})^* P_i] - \frac{2k^3}{3} |P_i|^2 \right) \quad (9)$$

Recently, this method has been applied (Hermoso et al., 2013) to evaluate the optical properties of Ag, Au and Cu triangular nanodisks with edge lengths of 40, 60, 80 and 100 nm and a thickness of 10 nm. They showed that the most intense mode corresponds to the in plane dipole, and for gold this mode varies in the range of 700 to 900 nm as the edge length increases from 40 to 100 nm. The reason for the bathochromic shift is the charge separation increase associated with the large particles size. Furthermore, for Au particles, the in-plane quadrupole and octupole resonances yield two weak and broad bands at 580 and 620 nm, respectively. The bathochromic shift is less pronounced for the quadrupole and octupole modes, than for the dipole modes.

Fig. 6. (A) Dark-field optical image, (B) hyperspectral image, (C) extinction spectra of the AuND suspension (top) and (C) and (D) scattering spectra of the individual nanodisks.

Please cite this article in press as: Grasseschi, D., et al., Hyperspectral dark-field microscopy of gold nanodisks, Micron (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2014.10.007>

4. Result and discussion

Scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) images of typical gold nanodisks (AuND) can be seen in Fig. 3. In this particular example, the average diameter and thickness of the gold nanodisks were 25 and 2.5 nm, respectively. This sample will be referred as AuND-25. The AuND particles actually exhibit a quasi-hexagonal or a triangular form. This is not accidental, since hexagonal nanodisks can be regarded as snipped triangular nanodisks. As a matter of fact, although one can find some intact triangular species, most of the particles exhibit hexagonal, or eventual trapezoidal shape, suggesting indeed, the occurrence of a tip snipping process.

The extinction spectra of a suspension of AuND-25 can be seen in Fig. 4B. In solution, the absorption spectra exhibit a characteristic band at 530 nm, ascribed to the average in-plane dipole oscillation of the plasmons (Hanarp et al., 2003). The dark field optical image of AuND-25 (Fig. 4A) exhibits a homogeneous dispersion of particles, which are seen as bright green spots, evidencing similar optical properties. The scattering spectra of individual nanoparticles are shown in Fig. 4B. They display a single scattering peak in the 548–584 nm range, slightly shifted from the extinction (absorption + scattering) maximum (530 nm) recorded in solution, because of the lack of the absorption component and of the presence of a distinct dielectric constant, as predicted by Eq. (4), associated with microscopy glass plates. The several individual scattering spectra reflect distinct size effects on the resonance frequency of the in-plane dipolar plasmon modes.

Another sample obtained by using more concentrated HAuCl₄ solutions, was composed by AuNDs exhibiting an average diameter and thickness distribution around 50 and 13 nm, respectively. This sample was here referred as AuND-50. In a very fortuitous measurement, the SEM image exposed the lateral profiles of the AuNDs, forming stacked arrangements, as shown in Fig. 5. In this image, one can also observe the presence of the triangular and hexagonal nanodisks, as well as, their corresponding diameters and thickness.

The dark-field image, composed by a three channel RGB spectra, in Fig. 6A, is compared with the hyper-spectral image, Fig. 6B, where each pixel has a full spectral information. The spatial resolution in both images is $\lambda/5$ but the observed nanoparticles sizes do not reflect their real dimension, due to the plasmonic enhanced scattering effects. In those images the large AuNDs appear as bright yellow spots, in addition to a few smaller nanodisks, in green color, and some reddish spots ascribed to small triangular nanodisks. Such reddish spots are also present in Fig. 4, but at a very low extent. As expected, no evidence of nanoparticles signals or imaging could be detected using a conventional optical microscope.

The extinction spectra of the AuND-50 suspensions are composed by two broad bands at 535 and 731 nm (Fig. 6C – top). In contrast, the Cytoviva scattering spectra of the individual nanodisks exhibit peaks in the range of 576–730 nm, displaying very distinct profiles (Fig. 6C – bottom and Fig. 6D).

A blue shift of all plasmonic modes, and a relative weak intensity for the out of plane modes are expected in the extinction spectra of the smaller AuNDs (Hermoso et al., 2013) due to the permittivity changes associated with their very small thickness (Alcaraz de la Osa et al., 2012). The smaller nanodisks are responsible for the bright green spots in the dark-field image. The corresponding peaks are located below 580 nm, in agreement with the data from Fig. 4, involving the in-plane dipolar SPR mode. The spectra with $\lambda_{\max}$ around 700 nm can be attributed to triangular nanodisks, in agreement with the DDA theoretical calculations reported in the literature (Hermoso et al., 2013).

At a first glance, the large nanoparticles cannot be differentiated in the dark-field images, due the composite signals resulting from the red and green channels. However, their hyperspectral data

Fig. 7. (A) Hyperspectral image, (B) deconvoluted scattering spectra of a triangular AuND-50 (bottom), exhibiting moderate (center) and severe snipping (top).

exhibit more than one peak and by a simple deconvolution procedure it is possible to discriminate the hexagonal disks from the triangular ones, as shown in Fig. 7. The observed changes in the scattering spectra were associated with the tip snipping of the triangular particles, increasing from the bottom to the top spectra. The presence of four components is consistent with the expected resonance with the in-plane or out-of-plane, dipolar or quadrupolar modes.

Accordingly to Mirkin et al., due to the electromagnetic field distribution at the metallic surface, when the triangular nanodisks are snipped, the in-plane dipolar modes undergo blue shifts, while the quadrupole modes present a small or no shift (Millstone et al., 2005, 2009; Pastoriza-Santos and Liz-Marzán, 2008). Accordingly, the blue shifted band at 645 nm can be ascribed to the in-plane dipolar modes, while the observed weak shoulder around 560 nm can be tentatively assigned to the out-of-plane oscillations of the quadrupolar mode. By exclusion, the band around 730 nm and the shoulder at 813 nm should be ascribed to the in-plane quadrupolar mode, and to the out-of-plane dipolar mode, respectively.

5. Conclusion

Individual nanodisks can be successfully monitored by high resolution dark-field hyperspectral microscopy, thanks to the enhanced scattering promoted by the surface plasmon excitation. In addition, their corresponding spectral data allow the differentiation of the nanoparticles size and shape. The presence of triangular gold nanodisks supports the generation of hexagonal species by a progressive tip snipping process. For small thickness (0.5–3 nm) nanoparticles, the out-of-plane plasmon modes are not observed and the light scattering process is dominated by the in-plane dipole and quadrupole modes. The out-of-plane modes become visible when the particles thickness is around 15 nm, as predicted from the DDA theoretical studies (Hermoso et al., 2013).

Acknowledgements

The financial support from FAPESP (Projects 2013/50096-4 and 2011/00037-6), CNPq, NAP-NN and PETROBRAS is gratefully acknowledged.

References

- Alcaraz de la Osa, R., Sanz, J.M., Saiz, J.M., González, F., Moreno, F., 2012. Quantum optical response of metallic nanoparticles and dimers. *Opt. Lett.* 37 (23), 5015–5017, <http://dx.doi.org/10.1364/OL.37.005015>.
- Burda, C., Chen, X., Narayanan, R., El-Sayed, M.A., 2005. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Rev.* 105 (4), 1025–1102, <http://dx.doi.org/10.1021/cr030063a>.
- Draine, B.T., Flatau, P.J., 1994. Discrete-dipole approximation for scattering calculations. *J. Opt. Soc. Am. A* 11 (4), 1491, <http://dx.doi.org/10.1364/JOSAA.11.001491>.
- Fan, J.A., Bao, K., Lassiter, J.B., Bao, J., Halas, N.J., Nordlander, P., Capasso, F., 2012. Near-normal incidence dark-field microscopy: applications to nanoplasmonic spectroscopy. *Nano Lett.* <http://dx.doi.org/10.1021/nl300160y>.
- Féridj, N., Aubard, J., Lévi, G., 1999. Discrete dipole approximation for ultraviolet-visible extinction spectra simulation of silver and gold colloids. *J. Chem. Phys.* 111 (3), 1195, <http://dx.doi.org/10.1063/1.479305>.
- Hanarp, P., Käll, M., Sutherland, D.S., 2003. Optical properties of short range ordered arrays of nanometer gold disks prepared by colloidal lithography. *J. Phys. Chem. B* 107 (24), 5768–5772, <http://dx.doi.org/10.1021/jp027562k>.
- Hermoso, W., Alves, T.V., de Oliveira, C.C.S., Moriya, E.G., Ornellas, F.R., Camargo, P.H.C., 2013. Triangular metal nanoprisms of Ag, Au, and Cu: modeling the influence of size, composition, and excitation wavelength on the optical properties. *Chem. Phys.* 423, 142–150, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphys.2013.07.008>.
- Hu, M., Novo, C., Funston, A., Wang, H., Staleva, H., Zou, S., Hartland, G.V., 2008. Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance. *J. Mater. Chem.* 18 (17), 1949–1960, <http://dx.doi.org/10.1039/b714759G>.
- Jain, P.K., Lee, K.S., El-Sayed, I.H., El-Sayed, M.A., 2006. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B* 110 (14), 7238–7248, <http://dx.doi.org/10.1021/jp057170o>.
- Link, S., El-Sayed, M.A., 2000. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.* 19 (3), 409–453, <http://dx.doi.org/10.1080/01442350050034180>.
- Link, S., El-Sayed, M.A., 2003. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 54, 331–366, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103759>.
- Maier, S.A., 2007. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer, United Kingdom.
- Mie, G., 1908. Articles on the optical characteristics of turbid tubes, especially colloidal metal solutions. *Annalen Der Physik* 25 (3), 377–445.
- Millstone, J.E., Hurst, S.J., Métraux, G.S., Cutler, J.L., Mirkin, C.A., 2009. Colloidal gold and silver triangular nanoprisms. *Small* 5 (6), 646–664, <http://dx.doi.org/10.1002/sml.200801480>.
- Millstone, J.E., Park, S., Shuford, K.L., Qin, L., Schatz, G.C., Mirkin, C.A., 2005. Observation of a quadrupole plasmon mode for a colloidal solution of gold nanoprisms. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (15), 5312–5313, <http://dx.doi.org/10.1021/ja043245a>.
- Pastoriza-Santos, L., Liz-Marzán, L.M., 2008. Colloidal silver nanoplates: state of the art and future challenges. *J. Mater. Chem.* 18 (15), 1724, <http://dx.doi.org/10.1039/b716538b>.
- Sardar, R., Funston, A.M., Mulvaney, P., Murray, R.W., 2009. Gold nanoparticles: past, present, and future. *Langmuir* 25 (24), 13840–13851, <http://dx.doi.org/10.1021/la9019475>.
- Sherry, L.J., Jin, R., Mirkin, C.A., Schatz, G.C., Van Duyne, R.P., 2006. Localized surface plasmon resonance spectroscopy of single silver triangular nanoprisms. *Nano Lett.* 6 (9), 2060–2065, <http://dx.doi.org/10.1021/nl061286u>.
- Stewart, M.E., Anderton, C.R., Thompson, L.B., Maria, J., Gray, S.K., Rogers, J.A., Nuzzo, R.G., 2008. Nanostructured plasmonic sensors. *Chem. Rev.* 108 (2), 494–521, <http://dx.doi.org/10.1021/cr068126n>.
- Vainrub, A., Pustovoy, O., Vodyanov, V., 2006. Resolution of 90 nm (λ/5) in an optical transmission microscope with an annular condenser. *Opt. Lett.* 31 (19), 2855, <http://dx.doi.org/10.1364/OL.31.002855>.
- Vodyanov, V., Pustovoy, O., Vainrub, A., 2007. In: Hoover, R.B., Levin, G.V., Rozanov, A.Y., Davies, P.C.W. (Eds.), *High Resolution Light Microscopy of Nanoforms*, pp. 669413–1–669413–12, <http://dx.doi.org/10.1117/12.731462>.

Research article

Journal of
RAMAN
SPECTROSCOPY

Received: 18 February 2014

Revised: 23 June 2014

Accepted: 4 July 2014

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jrs.4562

SERS studies of isolated and agglomerated gold nanoparticles functionalized with a dicarboxybipyridine-trimercaptotriazine-ruthenium dye

Daniel Grasseschi, Andre L. A. Parussulo, Vitor M. Zamarion, Robson R. Guimarães, Koiti Araki and Henrique E. Toma*

A dicarboxybipyridine-trimercaptotriazine ruthenium complex, primarily designed for dye solar cells, has been successfully employed for generating electrostatically stabilized gold colloids, because of its high negative charge and capability of binding to gold nanoparticles via the sulfur groups. Surprisingly, a strong surface-enhanced Raman scattering enhancement has been observed for the isolated nanoparticles, exceeding those recorded after inducing agglomeration. Such unusual response has been ascribed to the predominant contribution of the charge-transfer and resonance Raman mechanisms, more than compensating for the lack of the local hot spots, in relation to the agglomerated systems. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

Keywords: SERS; gold nanoparticles; Ruthenium complex

Introduction

Surface-enhanced Raman scattering (SERS), has brought a renewed interest in Raman spectroscopy, turning a very low sensitive spectroscopic technique into a most sensitive one, extending the limit of detection to a single molecule. As a matter of fact, SERS has become an exciting subject of research, allowing the development of sensors for a large variety of species, from biomolecules^[1–8] to pesticides^[9,10] and heavy metals.^[2,11,12]

The SERS effect has been explained in terms of three main contributions or mechanisms: electromagnetic (EM), charge-transfer (CT) and resonance Raman (RR).^[13] The EM mechanism depends upon the arrangements of the nanoparticles or nanostructured surfaces and involves the so-called 'hot spots' or regions usually located at the junction of the aggregated nanoparticles, where there is a coupling of oscillating electric fields, generating much larger local fields.^[14] This mechanism is independent on the interaction of the molecules with the surface. When the molecules are randomly oriented in the space of the EM-plasmon field, practically all the vibrational modes can be intensified. However, if the molecules are bound to the surface, they will be subject to their orientations relative to the local oscillating electric field, and some additional EM selection rules should apply.^[15,16]

The intensification of the Raman scattering by the CT and resonance (RR) mechanism is strongly dependent on the molecules, because it is related to the enhanced polarizability attained as a consequence of the interaction of the EM radiation with the molecular electronic levels and the plasmon waves at the nanoparticles surface. Accordingly, the covalency and degree of charge delocalization on the nanoparticle/molecule interface should directly influence the SERS effect. When the molecule–nanoparticle bonding is less covalent, the electronic structure of the adsorbed molecule will be slightly

perturbed, causing a small change in the polarizability. In contrast, in the case of highly covalent systems, such as those involving thiol–gold interaction, the binding can generate delocalized wave functions and CT interactions from the nanoparticles Fermi level to the molecules LUMO ($E_F \rightarrow \text{LUMO}$), or reversely, from the molecules HOMO to the nanoparticles Fermi level ($\text{HOMO} \rightarrow E_F$).

Generally, in the SERS spectra of colloidal systems, the most intense signals come from the aggregated particles, because of the presence of 'hot spots', where the EM fields are concentrated. On the other hand, detailed studies concerning the SERS effect in isolated particles are yet missing in the literature, presumably because its occurrence is normally considered very unlikely or because most of the dyes employed as SERS probes tend to promote nanoparticles aggregation. As a matter of fact, rather specific conditions are required for stabilizing the isolated nanoparticles containing molecular Raman probes and prevent their aggregation.

In this sense, a successful strategy has been employed in this paper, using Raman probes capable of acting as stabilizing agents, such as the bis(dicarboxybipyridine)(trimercaptotriazine) ruthenium(II) complex, $[\text{Ru}(\text{dcb})_2\text{tmt}]^{2+}$ (Fig. 1). This species has been primarily designed for dye solar cell applications^[17] encompassing two dicarboxybipyridine ligands (dcb) as photoinjectors and binding groups to TiO_2 , and a trimercaptotriazine (tmt) ancillary ligand for improving light harvesting and promoting vectorial electron transfer through the complex. The presence of the tmt ligand has also been planned for allowing the exploitation of the plasmon

* Correspondence to: Henrique E. Toma, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 26077, CEP 05513-970, São Paulo, Brazil.
E-mail: henetoma@iq.usp.br

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Figure 1. Structural representation of the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex.

resonance effects in photoelectrochemical devices, using gold nanoparticles (AuNP).

As a matter of fact, the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{n-}$ dye is capable of binding gold nanoparticles via the sulfur ligand and stabilizing the AuNP colloids based on the electrostatic repulsions from the negatively charged complex.^[18] In addition, it displays strong metal-to-ligand CT bands in the visible, providing an excellent SERS probe. By means of dark-field hyperspectral and Raman confocal microscopy, it has been possible to distinguish between the isolated and agglomerated $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{n-}$ -AuNPs, from their distinct extinction spectra.^[18] However, a detailed Raman spectral study comparing the SERS response of such isolated and agglomerated nanoparticles has never been reported. This work covers the subject to a great detail, including the assignments of the electronic and Raman spectra and a discussion of the mechanisms involved in the SERS effect of the isolated nanoparticles.

Experimental

Materials

Ruthenium chloride ($\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), bis-2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid (dcbH_2), 2,4,6-trimercapto-1,3,5-triazine ($\text{C}_3\text{S}_3\text{N}_3\text{H}_3$ - tmt), trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - cit) and tetrachloroauric acid (HAuCl_4) were purchased from Sigma Aldrich. All other reagents were analytical grade and used as supplied.

The $[\text{Ru}(\text{dcbH}_2)_2(\text{tmt})]$ complex (1) was synthesized by the reaction of the tmt ligand with $[\text{Ru}(\text{dcbH}_2)_2\text{Cl}_2]$, as previously reported in the literature.^[17] Citrate-stabilized gold nanoparticles (cit-AuNP) were prepared according to the Turkevich^[19] method modified by Frens.^[20]

Instrumentation

Ultraviolet-visible absorption spectra were recorded on a Hewlett Packard 8453A diode-ray spectrophotometer, in the 190–1100-nm range. The pK_a values were determined by spectrophotometric titration using a quartz cuvette attached to a solution reservoir at the top and monitoring with a HP8453 diode-array spectrophotometer, in conjunction with pHmeter. Raman spectra using 785-nm excitation wavelength were recorded on an InPhotonics model INP-AA-785ZZ spectrophotometer, equipped with a diode laser. A WITec Confocal Raman Microscope, equipped with Ar, Nd:YAG and He-Ne lasers, was used for imaging and recording the Raman

spectra at 488, 532 and 633 nm respectively. All spectra were recorded using integration times of 120 s and 7.5-mW laser power.

Calculations

Theoretical calculations for the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex were carried out using the HyperChem Professional 8.05 program, starting with a MM+ geometry optimization with a conjugated gradient method, adopting $1 \times 10^{-7} \text{ kcal Å}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ as convergence criterion. Self-consistent field (SCF) molecular orbital (MO) calculations were performed at the RHF level using the ZINDO/S method^[21–23] and the default parameters $k_{\text{po}} = 1.267$ and $k_{\text{pt}} = 0.585$. The electronic spectra were calculated considering single configuration interactions, in an active space of 20 frontier MOs consisting of 10 highest occupied and 10 lowest unoccupied MOs. Theoretical calculations of the vibrational normal modes of free ligands were carried out using the DFT method and a 6-31G(d) basis set for the hybrid functional B3LYP, implemented in the Gaussian 03 W program.

Results and discussion

Electronic spectra of $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$

The mixed ligand complex $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ (Fig. 1) encompasses several coordinating groups, most of them participating from the inner sphere shell around the ruthenium(II) center. In this complex, dcb is acting as a bidentate ligand through the two bipyridyl N-atoms, leaving four peripheral carboxylate free groups while tmt is coordinated in a bidentate mode by the nitrogen and sulfur atoms, leaving two thiol groups and a heterocyclic nitrogen for interacting with the gold nanoparticles.

At pH 4, the dcb ligands are deprotonated,^[24] generating the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ species, here denoted (3) because of its trinegative charge. Above pH 12, the complex is completely deprotonated and referred as (5). More detailed acid-base equilibria discussion can be found in the Supporting Information. The electronic spectrum exhibits a sharp and strong band around 300 nm ($\epsilon = 52,000 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$), assigned to ligand internal transitions, in addition to three CT bands at 367 ($\epsilon = 14,200 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$), 465 ($\epsilon = 9,600 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$) and 505 nm ($\epsilon = 11,700 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$), as shown in Fig. 2.

ZINDO/S theoretical calculations for $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ are shown in Table 1 and detailed in the Supporting Information (Table S1).

Figure 2. Electronic spectra of $1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ solutions of $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ (3) (red line) and $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{5-}$ (5) (black line) in aqueous solution. The dashed vertical lines indicate the laser lines used in Raman experiments. (This figure is available in colour online at [wileyonlinelibrary.com/journal/jrs](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/jrs))

Table 1. Assignment of the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ electronic spectra

$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ $\epsilon/10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$	Assignment	Molecular orbital	Oscillator strength
300 (5.20)	MLCT Ru $\rightarrow$ dcb	116 $\rightarrow$ 124	0.0390
305	$\pi \rightarrow \pi^*$	117 $\rightarrow$ 123	0.0481
369 (1.42)	MLCT-1: Ru $\rightarrow$ dcb	117 $\rightarrow$ 124, 125	0.1907
465 (0.96)	MLCT-3: Ru $\rightarrow$ tmt	115 $\rightarrow$ 118	0.1364
528 (1.17)	MLCT-2: Ru $\rightarrow$ dcb	117 $\rightarrow$ 118, 119	0.1132

The composition of the frontier MOs indicates a predominant Ru(II) character for the HOMO levels (MO115, 116, 117), while the LUMO levels (MO118, 119) exhibit preponderant contributions from the dcb and tmt π^* orbitals, revealing a high degree of electronic mixing in the complex. The observed bands at 371 and 532 nm are assigned to metal-to-ligand CT transitions (MLCT) from the MO MO117 (60% Ru) to MO124 and MO119, or MLCT-1 and MLCT-2, respectively, centered on the bipyridine rings. The central band observed at 465 nm (MLCT-3) can be attributed to a $\text{Ru}(\text{da}) \rightarrow \text{tmt}(\text{pn}^*)$ CT transition (MO115 $\rightarrow$ MO118) involving significant contributions from the dcb π^* orbitals.

The assignment of the ultraviolet-visible spectra shown in Table 1 is in harmony with those previously proposed for the $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{SCN})_2]$, $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{Cl})_2]$ and $(\text{Bu}_4\text{N})_4 \text{ cis-}[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{NCS})_2]$ complexes.^[24,25] A consistent assignment of such CT transitions is particularly relevant in our case, because the MO compositions will be essential for explaining the Raman spectra of the complex.

Table 2. Assignment of the Raman spectrum of the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex

Wavenumber/ cm^{-1}	Assignment
306	Ru-N stretching
461	dcb CCC deformation
541	tmt ring deformation out of plane
1029	Ring breath centered on 'N' atoms of tmt + ring breath of dcb
1152	tmt NCN stretching + CS deformation
1264	tmt + dcb CN stretching
1300	COO ⁻ stretching
1370	tmt asymmetric ring stretching
1477	dcb symmetric CC + CN stretching
1545	dcb asymmetric CC + CN stretching
1614	dcb symmetric CC + CN stretching

Raman spectra of $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$

The free tmt ligand has a high symmetry (C_{3h}), and the most intense modes (ring breathing and ring deformation) are substantially perturbed by the interaction with transition metal complexes and metal surfaces.^[11]

The Raman spectra of $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ can be seen in Fig. 3. The assignment (Table 2) was carried out by comparison with the available data for $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$,^[26–28] $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{NCS})_2]^{2+}$,^[29] and for tmt-AuNP system.^[11] In the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex, the intensification of both tmt and dcb ligands normal modes are expected to occur, because of their contribution to the LUMOs involved in MLCTs. As a matter of fact, the Raman spectra obtained by exciting

at 488 and 532 nm, in resonance with MLCT-3 and MLCT-2, respectively, exhibit contrasting enhancement profiles (Fig. 3). The dcb peaks arising from the characteristic dcb C–C and C–N stretching modes can be seen at 1614, 1545 and 1477 cm^{-1} and are strongly enhanced, particularly at 532 nm. The weak bands at 538, 1375 cm^{-1} and the shoulder at 1655 cm^{-1} can be attributed to tmt normal modes and are better evidenced at 488 nm.

SERS spectra of $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ on cit-AuNPs

The SERS experiments were carried out by mixing the complex solution ($1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) at pH 4, with a cit-AuNP suspension, such that the final complex concentration was $2 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

The electronic spectrum of cit-AuNP suspension (Fig. 4) exhibited the characteristic plasmon band at 525 nm consistent with an

Figure 3. Resonance Raman Spectra of the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complexes (0.01 mol l^{-1}) in aqueous solutions at pH 4, obtained at $\lambda_{\text{exc}} = 488$ and 532 nm and 7.5 mW of power. The tmt modes are indicated by an asterisk.

Figure 4. Extinction spectrum of AuNP-cit (black line) and AuNP- $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ at pH 4 (red line, top). (This figure is available in colour online at wileyonlinelibrary.com/journal/jrs)

average size of 40 nm, as measured by SEM and dynamic light scattering (Fig. S2). When the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex was added to the cit-AuNP suspension, only a small increase of absorbance coinciding with the plasmonic band was observed, due to contribution of their visible MLCT bands. It should be noted that the spectral baseline was strictly preserved, with no evidence of a plasmon coupling band above 700 nm. This band is always observed in the case of aggregation, and its absence corroborates the nanoparticles stabilization promoted by the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complexes. Direct evidence of the isolated nanoparticles in this system has already been obtained using dark-field hyperspectral microscopy (Cytoviva).^[18] For the systems containing the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex, the dark-field spectral imaging is essentially consist of isolated nanoparticles, and their spectra exhibited exclusively the characteristic surface plasmon band around 550 nm. By adding electrolytes, the hyperspectral imaging showed the presence of aggregates displaying the characteristic plasmon coupling band above 700 nm.

The chemical environment around the isolated nanoparticles can influence the plasmon bandwidth, because of the dephasing of the oscillating electrons promoted by non-coherent electron–electron, electron–phonon and electron–surface scattering processes. The dephasing term also encompasses radiative and nonradiative decay processes^[30,31] and is influenced by the size,^[32,33] the shape^[34] and the chemical environment around the nanoparticles.^[35–38] Molecular species covalently bonded to the nanoparticle surface can transfer or receive electron density from metallic nanoparticles, depending upon the degree of interaction of their HOMO and LUMO levels, respectively, with the unoccupied and occupied band levels of the metal nanoparticles. Such a charge delocalization expands the resonance volume to a region of contrasting electron mobility, promoting the breakdown of coherence and causing the broadening of plasmon band. This phenomenon is also known as chemical interface damping.^[37,38]

In order to provide a reliable comparison between the plasmon bandwidths, the same stock suspension has been employed throughout the experiments, eliminating any possible influence from the size and shape of the gold nanoparticles in the extinction spectra.

Careful bandwidth calculations, using spectral deconvolution procedures, showed that the plasmon band is only slightly broadened when $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ interacts with cit-AuNP, increasing from 0.459 (109 nm) to 0.484 eV (115 nm).

Typical Raman spectra of the isolated $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ /AuNPs can be seen in Fig. 5, showing large enhancements in relation to the spectrum of the pure complex in solution (Fig. 3), characterizing the occurrence of the SERS effect.

Because of the lack of interfacial hot spots, the occurrence of SERS in isolated nanoparticles has been considered little plausible, particularly in terms of a purely EM mechanism, and for this reason, its investigation has been neglected up to the present time. However, it should be noted that the main requisite, which is the resonance of the oscillating EM radiation with the localized surface plasmons, remains very effective even in the case of the isolated gold nanoparticles. Actually, it is responsible for their bright red colors. In addition, in isolated nanoparticles, one can also find an enhanced polarizability due to the interaction of the molecules with the surface plasmons. In this way, isolated nanoparticles should be intrinsically capable of exhibiting SERS effect, even in the lack of interfacial hot spots.

This argument can be better discussed on the basis of the unified SERS approach recently introduced by Lombardi and Birke^[39] as expressed by Eqn (1).

Figure 5. SERS spectra of the isolated $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ /AuNP at 532 and 488 nm.

$$R_{\text{FK}}(\omega) = \frac{\mu_{\text{FK}}\mu_{\text{FK}}h_{\text{F}}\langle i|Q_{\text{K}}|f\rangle}{\left[(\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_2^2\right] \left(\omega_{\text{FK}}^2 - \omega^2 + \gamma_{\text{FK}}^2\right) \left(\omega_{\text{K}}^2 - \omega^2 + \gamma_{\text{K}}^2\right)} \quad (1)$$

The first term in the denominator represents the contribution of the EM mechanism. It includes the dielectric functions of the metallic nanoparticle $[\epsilon_1(\omega)$ and $\epsilon_2]$ and surrounding chemical environment (ϵ_m) and is minimized (i.e. the effect is maximized) at the plasmon resonance band. This term effectively incorporates the plasmon resonance effect in the isolated nanoparticles. The second term involves the CT interactions between the nanoparticle Fermi level (F) and the electronic states (K) of the molecules attached to the surface. The third term accounts for the RR effect of the adsorbed molecules, and this contribution is maximized when the excitation laser is in resonance with a totally allowed electronic transition involving the ground (I) and an excited (K) state. When the three mechanisms are operating, the unified approach predicts a large enhancement of the polarizability transition momentum.

The numerator in Eqn (1) contains the product of the transition moments for the adsorbed molecules (μ_{FK}), the nanoparticle–molecule CT (μ_{FK}), the Herzberg–Teller term $h_{\text{F}} = \langle i|\partial H/\partial Q|f\rangle$ and the vibrational integral $\langle i|Q_{\text{K}}|f\rangle$. It essentially defines the selection rules for the intensification of a given normal mode by SERS effect. It should be noticed that the oscillating electric field of isolated nanoparticles exhibits an r^{-3} dependence (r is the distance from the nanosphere center). Therefore, only the molecules located very closely to the nanoparticles surface can significantly interact with the oscillating plasmons and their vibrational modes be enhanced.^[30,40]

In the case of the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ /AuNP system, at 532 nm, the excited radiation is in resonance with the surface plasmon band and the MLCT-2 band, simultaneously, depicting an ideal condition for the occurrence of the EM and RR mechanisms. In addition, owing to the covalent interaction between the complexes and the gold atoms via the tmt ligand, an effective CT process should also take place, as expected for the CT mechanism. Therefore, the three mechanisms (EM, RR and CT) can simultaneously operate in our system, explaining the large enhancement in the SERS signals observed for the isolated nanoparticles, as predicted by Eqn (1).

Isolated and agglomerated gold nanoparticles

It should be noted that the dipole transition moment exhibits an appropriate orientation for the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ species anchored on the AuNPs by one sulfur atom. As shown in Fig. 6, at this configuration, the dcb centered, MO119 orbital is oriented out of the gold surface, and when the Ru-dcb CT is excited, the coupling between its transition moment and the particle dipole moment is maximized. In this sense, the rising of the tmt asymmetric ring stretching mode at 1370 cm^{-1} in SERS spectra seems to corroborate the hypothesis, as shown in Fig. 6(c), because the corresponding transition dipole moment has a normal orientation to the gold surface.

At 488 nm, the excitation wavelength does not coincide with maximum plasmon band but characterizes a pre-resonance condition. The SERS spectra (Fig. 5) exhibited a similar profile of the RR spectra associated with the Ru $\rightarrow$ tmt CT band in the free complex, using the 488-nm laser (Fig. 3), showing a predominant contribution of the tmt normal modes. This can be seen by the enhancement of the broad band at 1655 cm^{-1} and of the intensities of the tmt normal modes at 1370 and 1150 cm^{-1} . The relative intensities of the dcb normal modes at 1614 , 1545 and 1477 cm^{-1} reflect the contribution of the corresponding EM and RR mechanisms, under a pre-resonance condition.

At 633 and 785 nm, there is no resonance of the exciting radiation with the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex in the isolated nanoparticles, and the SERS signals practically disappear. Under this circumstance, in order to observe the SERS spectra, it is necessary to aggregate the colloidal system for generating the typical plasmon coupling band in the 600–800-nm range.^[14] Such aggregation can be induced by increasing the ionic strength, e.g. with NaI. In our case, because of the electrostatic stabilization of the system, a large amount of salt (NaI) was necessary (e.g. 3 mmol l^{-1}) for promoting aggregation (Fig. 7).

The Raman spectra for the aggregated system, obtained at $\lambda_{\text{exc}} = 633$ and 785 nm , can be seen in Fig. 8. There is a general enhancement of the vibrational modes of dcb (e.g. 1614 , 1545 and 1477 cm^{-1}) and tmt (e.g. 1370 , 1029 , 707 and 562 cm^{-1}), consistent with the involvement of an EM mechanism. Surprisingly, in spite of the resonance condition with the plasmon coupling band, the observed SERS intensities were much smaller in relation to the non-aggregated system. This means that the contribution of the EM mechanism in the aggregated nanoparticles is not enough to overcome the lack of tuning with the resonance (RR) and CT excitations in the isolated nanoparticles.

Figure 7. Extinction spectra of $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}/\text{AuNP}$ nanoparticles (solid line) and after aggregation with different concentrations of NaI, 1 mmol l^{-1} (red traces), 2 mmol l^{-1} (blue dots) and 3 mmol l^{-1} (green traces and dots). (This figure is available in colour online at wileyonlinelibrary.com/journal/jrs)

Figure 8. Normalized SERS spectra for the isolated $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}/\text{AuNP}$ at pH4 using 488 and 532 excitation, and for the aggregated species (NaI, 3 mmol l^{-1}), under hot spot conditions, using the 633 and 785-nm excitation lasers. The scale factors used to normalize the spectra in relation to that at 532 nm are shown in parenthesis.

Figure 6. (a) Pictorial illustration of the binding of the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{tmt})]^{3-}$ complex and AuNP, (b) orientation of the LUMO relative to AuNP surface and (c) representation of the tmt asymmetric ring stretch normal mode at 1370 cm^{-1} .

Conclusions

The contrasting behavior observed in this work for the Raman spectra of the agglomerated and non-agglomerated systems supports the conclusion that strong SERS enhancements can also be obtained for isolated gold nanoparticles. An important condition, in this case, is that the contribution of the RR and CT intensification mechanisms should be quite large, in order to compensate for the lack of local hot spots, in relation to the aggregated systems.

Acknowledgement

Financial support from FAPESP, CNPq and Petrobras is gratefully acknowledged.

References

- [1] C. L. Haynes, C. R. Yonzon, X. Zhang, R. P. Van Duyne, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 471.
- [2] M. E. Stewart, C. R. Anderton, L. B. Thompson, J. Maria, S. K. Gray, J. A. Rogers, R. G. Nuzzo, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 494.
- [3] E. Prado, N. Daugey, S. Plumet, L. Servant, S. Lecomte, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7425.
- [4] L. Zhang, Q. Q. Li, W. Tao, B. H. Yu, Y. P. Du, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1827.
- [5] A. Matschulat, D. Drescher, J. Kneipp, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3259.
- [6] D. Graham, K. Faulds, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1042.
- [7] J. D. Driskell, O. M. Primera-Pedroza, R. A. Dluhy, Y. P. Zhao, R. A. Tripp, *Appl. Spectrosc.* **2009**, *63*, 1107.
- [8] P. H. Hsu, H. H. K. Chiang, *J. Raman Spectrosc.* **2010**, *41*, 1320.
- [9] J. C. S. Costa, R. A. Ando, A. C. Sant'Ana, L. M. Rossi, P. S. Santos, M. L. A. Temperini, P. Corio, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7491.
- [10] D. Lee, S. Lee, G. H. Seong, J. Choo, E. K. Lee, D. G. Gweon, *Appl. Spectrosc.* **2006**, *60*, 373.
- [11] V. M. Zamarion, R. A. Timm, K. Araki, H. E. Toma, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2934.
- [12] D. Grasseschi, V. M. Zamarion, K. Araki, H. E. Toma, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9146.
- [13] S. M. Morton, D. W. Silverstein, L. Jensen, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3962.
- [14] N. J. Halas, S. Lal, W.-S. Chang, S. Link, P. Nordlander, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3913.
- [15] X. P. Gao, J. P. Davies, M. J. Weaver, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 6858.
- [16] M. Moskovits, *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 4408.
- [17] R. R. Guimarães, A. L. A. Parussulo, H. E. Toma, K. Araki, *Inorg. Chim. Acta* **2013**, *404*, 23.
- [18] D. Grasseschi, A. L. A. Parussulo, V. M. Zamarion, R. R. Guimarães, K. Araki, H. E. Toma, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 24465.
- [19] J. Turkevich, P. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday* **1951**, *11*, 55.
- [20] G. Frens, *Nat.-Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20.
- [21] M. C. Zerner, G. H. Loew, R. F. Kirchner, U. T. Mueller-Westerhoff, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 589.
- [22] A. D. Bacon, M. C. Zerner, *Theor. Chem. Acc. Theory, Comput. Modell. (Theoretica Chim. Acta)* **1979**, *53*, 21.
- [23] S. I. Gorelsky, A. B. P. Lever, M. Ebadi, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *230*, 97.
- [24] M. K. Nazeeruddin, S. M. Zakeeruddin, R. Humphry-Baker, M. Jirousek, P. Liska, N. Vlachopoulos, V. Shklover, C.-H. Fischer, M. Grätzel, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 6298.
- [25] S. M. Zakeeruddin, M. K. Nazeeruddin, R. Humphry-Baker, M. Grätzel, *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *296*, 250.
- [26] P. K. Mallick, G. D. Danzer, D. P. Strommen, J. R. Kincaid, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 5628.
- [27] S. Schneider, G. Brehm, C. J. Prenzel, W. Jäger, M. I. Silva, H. D. Burrows, S. T. Formosinho, *J. Raman Spectrosc.* **1996**, *27*, 163.
- [28] H. R. Virdee, R. E. Hester, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 451.
- [29] C. Pérez León, L. Kador, B. Peng, M. Thelakkat, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 5783.
- [30] S. A. Maier, *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, Springer, United Kingdom, **2007**.
- [31] F. Hubenthal, *Prog. Surf. Sci.* **2007**, *82*, 378.
- [32] J. Lermé, H. Balda, C. Bonnet, M. Broyer, E. Cottancin, A. Crut, P. Maioli, N. Del Fatti, F. Vallée, M. Pellarin, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2922.
- [33] J. Lermé, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 14098.
- [34] L. Qiu, T. A. Larson, D. Smith, E. Vitkin, M. D. Modell, B. A. Korgel, K. V. Sokolov, E. B. Hanlon, I. Itzkan, L. T. Perelman, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *93*, 153106.
- [35] L. de S. Menezes, E. Almeida, A. C. L. Moreira, A. M. Brito-Silva, C. B. de Araujo, in 2011 Conf. Lasers Electro-Optics Eur. 12th Eur. Quantum Electron. Conf. (CLEO Eur.), IEEE, **2011**, p. 1.
- [36] V. P. Zhdanov, C. Hägglund, B. Kasemo, *Surf. Sci.* **2005**, *599*, L372.
- [37] T. Linnert, P. Mulvaney, A. Henglein, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 679.
- [38] B. N. J. Persson, *Surf. Sci.* **1993**, *281*, 153.
- [39] J. R. Lombardi, R. L. Birke, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 734.
- [40] R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2006**.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

Confocal Raman microscopy and hyperspectral dark field microscopy imaging of chemical and biological systems

Henrique E. Toma,* Jorge da Silva Shinohara, Daniel Grasseschi

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, C.Postal 26077, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil.

ABSTRACT

Hyperspectral imaging can provide accurate information on the distribution of the chemical species in materials and biological samples, based on the analysis of their electronic and vibrational profiles. In special, confocal Raman microscopy is one of the best ways to access the chemical distribution of molecules, especially under resonance Raman or SERS conditions. On the other hand, enhanced dark field optical microscopy can be employed for hyperspectral imaging in the visible and near-IR region, while extending the optical resolution up to the nanoscale dimension. It allows the detection of gold or silver single nanoparticles, as well as spectral monitoring from the characteristic surface plasmon bands. These two hyperspectral microscopies can be conveniently combined to provide nanoscale electronic and vibrational information of the species present in a wide variety of chemical and biological systems. A case study focusing on the improvement of the classical spot-test analysis of nickel(II) ions with dithizone is here detailed. A great enhancement of sensitivity in the detection of nickel(II) ions, by at least 4 orders of magnitude, has been observed in this work. Hyperspectral measurements allowed the mapping of the gold nanoparticles (AuNP) distribution on cellulose fibers and on glass, and the evaluation of their extinction and SERS spectra for analytical purposes.

Keywords: Hyperspectral imaging, Confocal Raman, SERS, Gold Nanoparticles, Surface Plasmons.

1. INTRODUCTION

Hyperspectral microscopy is a modern way of exploring the imaging of materials and biological samples, conveying relevant spectral information of the molecules and nanoparticle constituents. By accessing the electronic or vibrational features embedded in every pixel, important analytical data can be obtained at the micro and nanoscale.

Recent progress in dark-field microscopy has extended the classical optical resolution limit ($\sim\lambda/2$) to $\lambda/5$, by exploring the higher resolution power from an oblique illumination, coupled with a cardoid annular condenser.^{1,2} In particular, this technique is particularly rewarding in the case of plasmonic nanoparticles, such as gold and silver, because, in addition to a higher resolution, the enhanced light scattering induced by the plasmon resonance, propagates as a cone, generating a magnification response capable of discriminating individual nanoparticles.^{3,4,5} In addition, by means of a coupled spectral detector, it is possible to record single nanoparticles scattering spectra, and generate the corresponding hyperspectral images from the collected data.

Another important tool is confocal Raman microscopy.⁶ Conventional Raman signals are extremely weak, however the scattering intensities increase with the forth power of the exciting radiation. For this reason, Raman scattering became an outstanding spectroscopic and analytical strategy only after the introduction of lasers in the excitation process. Confocal Raman microscopy associates a high-resolution setup with the Raman signals, allowing to probe the molecular characteristics of the samples, from the vibrational data composing every pixel of the image. In the presence of plasmonic nanoparticles such as gold, the Raman signals can be dramatically enhanced, exceeding 12 orders of magnitude, by means of the so-called SERS effect (surface enhanced Raman scattering). In this way, the presence of plasmonic nanoparticles can be explored for analytical purposes, in association with their strong Raman scattering, allowing a great increase of sensitivity in the investigation of chemical and biological samples.

*henetoma@iq.usp.br; phone 55 11 30913887, jorge.shinohara@usp.br, daniel.grasseschi@gmail.com

Combination of dark-field and confocal Raman microscopy enables the investigation of plasmonic excitation and SERS effect in a variety of systems, particularly those containing nanoparticles as optical and spectral probes. Typical examples encompass the elucidation of the spectral characteristics of isolated and aggregated gold nanoparticles⁵, the microscopy analysis of classical “spot-tests” in chemistry and forensics,⁷ the chemical imaging of shells⁸ and the phagocytosis of gold nanoparticles by neutrophil cells.⁹ In this article, the combined hyperspectral strategy is being explored as a new approach for improving the classical spot test analysis with the dithizone reagent for metal ions. The investigation was carried out on a filter paper and on a silanized glass, exploring the SERS effect of dithizone in the presence of gold nanoparticles.

The classical spot test experiment consists in impregnating a filter paper with the organic reagent dissolved in methanol, and observing the color changes after applying a drop of the metal ion solution. The detection is limited by the eyes sensitivity. Spot test analyses can be greatly improved using Raman spectroscopy, especially by exploring the strong signals from the chromophores in resonance with the exciting radiation. In addition, a further improvement can be achieved by means of the SERS effect associated with the gold nanoparticles.^{10,11,12} Such strategy has allowed to reach a single molecule detection limit, thus exceeding, in performance, most of the existing analytical tools. Therefore, probing the interaction of plasmonic nanoparticles and molecules by means of combined hyperspectral microscopies, introduces an important strategy which can open many exciting perspectives in chemistry and biology.

2. METHODOLOGY

A CytoViva ultra-resolution imaging system, composed by a dark-field hyperspectral arrangement mounted on an Olympus BX51 microscope, was used for recording the single particles Rayleigh scattering spectra. The dark-field configuration generates a hollow light cone focused on the specimen. Only the light scattered and diffracted inside the cone reaches the objective, which has a numerical aperture smaller than the numerical aperture of the dark-field condenser. The zero order diffracted light is not collected, and the particles appears as bright spots on a dark background. It is possible to record a dark-field optical image composed by a three channel RGB spectra with a spatial resolution of 64 nm, and a hyperspectral image where each pixel has 64 nm and carries a full visible spectral information. Due to the enhanced light scattering of the plasmonic nanoparticles, which propagates like a cone, even smaller nanoparticles, e. g. 15 nm, can be easily visualized in the microscope. For achieving a better spectral signal to noise ratio, a binning process can be performed by summing four pixels in order to yield a new 128 nm pixel. In this way, a more well defined spectrum can be generated.

Confocal Raman microscopy measurements were performed with a WITec alpha-300R equipment using frequency-doubled Nd:YAG ($\lambda = 532$ nm), argon ($\lambda = 488$ nm) and He-Ne ($\lambda = 633$ nm) lasers, and a single mode optical fiber. Raman spectra images were obtained by scanning the sample surface in the xy direction with a piezo-driven xyz feedback controlled scan stage, while collecting a spectrum at every pixel, using a high sensitivity Andor Technology, Newton model EMCCD detector. All experiments were conducted using a Nikon objective (100 $\times$, NA=0.8), and a laser power output lower than 2 mW/cm² to avoid thermal decomposition of the sample.

Citrate-stabilized gold nanoparticles (cit-AuNP) were prepared according to the Turkevich¹³ method modified by Frens.¹⁴ For the dark-field and Raman hyperspectral measurements, the samples were prepared by drop casting 1 μ l of Au nanoparticles suspension, after diluting by half with deionized water, on a NEXTERION® ultra-clean glass B (Schott). An ultra-clean NEXTERION® glass cover slip (Schott) was put over the drop, and sealed with adhesive tape to avoid oil penetration in the sample. The dark-field optical images and the Rayleigh scattering spectra were recorded with the sample wet, in order to keep the same refraction index.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Light scattering by plasmonic nanoparticles

Metals such as gold, silver and copper exhibit loosely bound electrons in the external shell which can interact with the oscillating electromagnetic radiation, behaving as localized plasmons (Figure 1). Such interactions generate oscillating dipoles in the particles, influencing the light scattering and absorption phenomena, as a function of the dielectric constants of the metal, $\epsilon = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega)$, where ω is the oscillating frequency, and of dielectric constant of the external media, ϵ_m .

Figure 1. Oscillating dipoles accompanying the plasmon waves in gold nanoparticles.

The scattering and absorption processes contribute to the measured optical absorbance,

$$A = \frac{N\sigma_{ext}d}{2.303}$$

where N and σ_{ext} are the concentration and extinction cross-section of the nanoparticles, and d is the optical pathway. The first theoretical treatment of the light extinction process by nanoparticles was proposed by G. Mie in 1908.¹³ It can be expressed by equation 1, where V is the nanoparticle volume.

$$\sigma_{ext} = 9 \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 \epsilon_m^{3/2} V \left(\frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + [\epsilon_2(\omega)]^2} \right) \quad (1)$$

The resonance condition, where σ_{ext} is maximum, is achieved when $\epsilon_1(\omega) = -2\epsilon_m$. In aqueous solution, the extinction spectra of typical spherical gold nanoparticles exhibit a maximum in the 520-570 nm range. When the nanoparticles are deposited on glass, the extinction spectra are shifted to the red, because of the changes in the dielectric constant.

Isolated, spherical gold nanoparticles monitored in the dark-field microscope can be seen in Figure 2, in comparison with the corresponding scanning electron microscopy image. The light scattering spectra can also be seen in Figure 2.d.

Figure 2. a) Dark-field, b) scanning electron microscopy, c) hyperspectral and d) scattering spectra of isolated gold nanoparticles (collected at spots 1-6) on glass. Figure reproduced with permission from ref. [3] COPYRIGHT 2013 Royal Society of Chemistry.

Aggregated nanoparticles can be seen in Figure 3. The scattering spectra of the aggregated nanoparticles are quite distinct from those of the isolated nanoparticles, and are dominated by the broad plasmon-coupling band in the 750-950 nm region.

Figure 3. a) Dark-field, b) scanning electron microscopy, c) hyperspectral and d) scattering spectra of aggregated gold nanoparticles (collected at spots 1-6) on glass. Figure reproduced with permission from ref. [3] COPYRIGHT 2013 Royal Society of Chemistry.

3.2 Hyperspectral studies in spot test analysis

Dithizone, Dz (1) is a classical complexing agent, and its reaction with Ni(II) ions was chosen to illustrate the application of combined hyperspectral dark field and confocal Raman microscopy in spot test analysis.

The Dz molecule exhibits a tautomeric thiol/thione equilibrium in aqueous and organic solutions, and the presence of the sulfur atom allows its interaction with gold nanoparticles,¹⁶ by forming strong Au-S covalent bond, presumably in a bidentate coordination mode, as indicated in scheme (2).

(2)

It should be noticed that most of the Raman and SERS studies are usually carried out with the samples dissolved or suspended in solution, or anchored on solid substrates. Aqueous solutions are particularly suitable for Raman studies, because of the lack of relevant signals from the solvent, in contrast with the infrared spectroscopy measurements. Cellulose, or paper, is also an excellent substrate in Raman spectroscopy, however, surprisingly, its use is relatively rare. In this regard, we have already shown that the Raman signals associated with most typical chromophores, such as those containing aromatic groups, are indeed much stronger than those arising from the paper substrate.¹⁶

In pure form, and under highly diluted conditions (e.g. 10^{-5} M) the Raman signals of Dz adsorbed on cellulose are too weak to be distinguished from the random noisy signals. However, in the presence of gold nanoparticles, the Dz Raman signals become very strong, as shown in Figure 4. The most strongly enhanced peaks of dithizone are observed at 1581 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{C-N}}$), 1336 ($\nu_{\text{N=N}}$), 1162 ($\nu_{\text{N-Ph}} + \delta_{\text{C-H}}$), 998 (ring breathing), and 511 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=S}}$). According to the tentative assignments (shown in parenthesis) based on the literature,¹⁷ the enhanced Raman peaks are mainly composed by C=S, N=N and C-N vibrations, thus supporting the binding of dithizone to the gold nanoparticles *via* the S and/or N atoms.

Figure 4. Raman spectra of paper impregnated with Dz (10^{-5} mol L^{-1}), bottom line and with Dz (10^{-5} mol L^{-1}) containing AuNP, top line.

At the micro and nanoscale, filter paper is not a flat or homogeneous surface material, but rather a collection of cellulose fibers, exposing hydroxyl groups for interacting with metal ions, organic reagents and nanoparticles. Although the Raman signals can be accurately recorded on this supporting material, because of the confocal optical resolution (~ 400 nm), the isolated gold nanoparticles cannot be individually probed as in the case of the dark-field microscopy, except when large aggregates are present. However, from the collected Raman signals, the hyperspectral image of the cellulose fibers containing gold nanoparticles can be obtained, as shown in Figure 5.

Figure 5. (A) Optical image of cellulose fibers impregnated with Dz-AuNP, (B) Image reconstructed using the peak area between 980 and 1020 cm^{-1} , (C) Raman spectra of three different spots (point A = top, point C = bottom).

The Dz molecule anchored on the gold nanoparticles is able to bind metal ions, such as Ni^{2+} , by displacing the internal H atom (scheme 3). The SERS spectra recorded before and after the addition of Ni^{2+} ions are shown in Figure 6. The spectral changes are quite evident in this Figure, even at 10^{-6}M , particularly at 1341 cm^{-1} and 542 cm^{-1} , associated with the $\nu_{\text{sym}}\text{N}=\text{C}-\text{N}$ and $\nu\text{C}-\text{S}$ vibrational modes, respectively. After incorporating nickel(II) ions, the rise of the new $\nu\text{C}-\text{S}$ band at 520 cm^{-1} suggests a gradual conversion of the chelate binding mode in Au-Dz to a more symmetric monodentate binding of the sulfur group (scheme 3). The use of the SERS effect in spot test analysis improved the detection of nickel(II) ions by at least four orders of magnitude in relation to the conventional colorimetric test.

(3)

Figure 6. SERS response of paper impregnated with Dz-AuNP, before (black) and after (red) applying 10 μL of Ni^{2+} solution ($\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$)

In order to observe the gold nanoparticles distribution on the cellulose, some fibers were removed from the filter paper and examined in the dark field microscope, as shown in Figure 7. In the hyperspectral image, the gold nanoparticles can be readily seen on the cellulose fibers, and their scattering spectra exhibit a broad band in the 800-850 nm range, corresponding to aggregated forms.

Figure 7. Dark field hyperspectral image of cellulose fibers with Dz-AuNP and their respective scattering spectra.

Alternatively, the classical spot test analysis on filter paper was also performed by anchoring the gold nanoparticles on glass, after the appropriate surface functionalization with triethoxyaminopropylsilane (APTS). The surface concentration of the gold nanoparticles was carefully monitored as a function of time and concentrations. In the absence of Dz molecules, by increasing the deposition time or nanoparticles concentration, the film density and the aggregated formation is greatly increased, as shown in Figure 8.

Figure 8. Dark field hyperspectral images of a AuNP film formed with different deposition time of a suspension diluted 25 times: (A) 5 min, (B) 30 min and (C) 60 min.

On the other hand, in the presence of Dz the AuNP colloidal stability is lost, due to the changes at the electric double layer, and the film prepared in APTS glass, at any AuNP concentration and deposition time, is always formed by aggregates. The dark-field hyperspectral exhibit extinction bands around 825 nm, typical of the plasmon coupling excitation in aggregated nanoparticles (see Figure 3). For analytical purposes, the formation of such aggregates is more interesting because of the enhancement of the SERS response due to the occurrence of the so called "hot spots" at the nanoparticles junctions.¹⁸ A typical result is shown in Figure 9. The corresponding SERS spectra were also sensitive to the presence of nickel(II) ions, however the results were rather noisy in comparison with the measurements carried out on filter paper.

Figure 9. (A) Dark field hyperspectral Image of a Dz-AuNP film and the scattering (B) spectra collected at spots 1-8, and (C) the SERS spectra.

4. CONCLUSION

Hyperspectral dark-field and confocal Raman microscopy can be conveniently employed in the speciation of chemical species, with a very high sensibility, by exploring the SERS effect promoted by the gold nanoparticles. The successful application to the spot test analysis illustrates the possibility of performing chemical analysis on filter papers, providing an accurate distribution of the chemical species based on the hyperspectral images. Such usefulness can be extended to the analysis and imaging of biological systems, combining the information from the optical and spectral microscopy, and the resonance plasmon effects associated with the gold nanoparticles.

Acknowledgements

The financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant 2013/24725-4 is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] Vodyanoy, V., Pustovyy, O., Vainrub, A., "High resolution light microscopy of nanoforms," Proc. SPIE 6694, 669413, San Diego, CA (2007).
- [2] Vainrub, A., Pustovyy, O., Vodyanoy, V., "Resolution of 90 nm ($\lambda/5$) in an optical transmission microscope with an annular condenser," Opt. Lett. **31**(19), 2855-57 (2006).
- [3] Grasseschi, D., Parussulo, A. L. A., Zamarion, V. M., Guimarães, R. R., Araki, K., Toma, H. E., "How relevant can the SERS effect in isolated nanoparticles be?," RSC Adv. **3**(46), 24465-72 (2013).
- [4] Grasseschi, D., Parussulo, A. L. A., Zamarion, V. M., Guimarães, R. R., Araki, K., Toma, H. E., "SERS studies of isolated and agglomerated gold nanoparticles functionalized with a dicarboxybipyridine-trimercaptotriazine-ruthenium dye," J. Raman Spectrosc. **45**(9), 758-63 (2014).
- [5] Grasseschi, D., Lima, F. S., Nakamura, M., Toma, H. E., "Hyperspectral Dark-Field Microscopy of Gold Nanodisks," Micron **69**, 15-20 (2015).
- [6] Dieing, T., Toporski, J., Hollricher, O., eds., Confocal Raman Microscopy, 1st ed., 279, Springer, Ulm (2010).
- [7] Huila, M. F. G., Lukin, N., Parussulo, A. L. A., Oliveira, P. V., Kyohara, P. K., Araki, K., Toma, H. E., "Unraveling the mysterious role of palladium in Feigl bis(dimethylglyoximate)nickel(II) spot tests by means of confocal Raman microscopy," Anal. Chem. **84**(7), 3067-69 (2012).
- [8] Paula, S. M., Huila, M. F. G., Araki, K. and Toma, H. E., "Confocal Raman and electronic microscopy studies on the topotactic conversion of calcium carbonate from Pomacea lineate shells into hydroxyapatite bioceramic materials in phosphate media," Micron **41**(8), 983-9, Elsevier Ltd (2010).
- [9] Uchiyama, M. K., Deda, D. K., Rodrigues, S. F. D. P., Drewes, C. C., Bolonheis, S. M., Kiyohara, P. K., Toledo, S. P. De., Colli, W., Araki, K., et al., "In vivo and In vitro Toxicity and Anti-Inflammatory Properties of Gold Nanoparticle Bioconjugates to the Vascular System," Toxicol. Sci. **142**(2), 497-507 (2014).
- [10] Aroca, R. F., "Plasmon enhanced spectroscopy," Phys. Chem. Chem. Phys. **15**(15), 5355-5363 (2013).

- [11] Eustis, S., El-Sayed, M. A., "Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes," *Chem. Soc. Rev.* **35**(3), 209–217 (2006).
- [12] Lombardi, J. R., Birke, R. L., "The theory of surface-enhanced Raman scattering," *J. Chem. Phys.* **136**(14), 144704 (2012).
- [13] Turkevich, J., Stevenson, P., Hillier, J., "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discuss. Faraday* **11**, 55–75 (1951).
- [14] Frens, G., "Controlled Nucleation for Regulation of Particle-Size in Monodisperse Gold Suspensions," *Nature-Physical Sci.* **241**(105), 20–22 (1973).
- [15] Mie, G., "Colloidal solutions," *Anellen der Phys.* **25**, 377–445 (1908).
- [16] Grasseschi, D., Zamarion, V. M., Araki, K., Toma, H. E., "Surface Enhanced Raman Scattering Spot Tests: A New Insight on Feigl's Analysis Using Gold Nanoparticles," *Anal. Chem.* **82**(22), 9146–49, (2010).
- [17] Pemberton, J. E., Buck, R. P., "Dithizone adsorption at metal electrodes. 4. Voltammetric and surface Raman spectroelectrochemical investigation at a copper electrode," *J. Am. Chem. Soc.* **104**(15), 4076–84 (1982).
- [18] Ghosh, S. K., Pal, T., "Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications," *Chem. Rev.* **107**(11), 4797–4862 (2007).

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 5716

Unraveling the nature of Turkevich gold nanoparticles: the unexpected role of the dicarboxyketone species†

Daniel Grasseschi, Rômulo A. Ando, Henrique E. Toma and Vitor M. Zamarion*

By monitoring the synthesis of the Turkevich gold nanoparticles, under appropriate conditions, it was possible to probe the formation of the dicarboxyketone intermediate species, revealing their unexpected strong interaction with the gold nanoparticles. The dicarboxyketone species exhibited a contrasting spectral and kinetics behaviour in relation to citrate stabilized products, explaining several existing controversial points, such as the lack of reproducibility and variable SERS response. In these species, because of the covalent interaction, the chemical mechanisms involved in SERS predominate over the electromagnetic contribution observed for the citrate stabilized gold nanoparticles. New interesting aspects were found, such as a greater stabilization and strong SERS response observed even for the non-aggregated nanoparticles.

Received 10th October 2014
Accepted 15th December 2014

DOI: 10.1039/c4ra12161a

www.rsc.org/advances

Introduction

From the several methods available in the literature for the synthesis of gold nanoparticles, such as that developed by Brust *et al.*¹ in organic media, and those involving anisotropic systems,^{2–8} the method of Turkevich *et al.*^{9,10} with some slight modifications by Frens,¹¹ remains yet the most preferred one for preparation of spherical gold nanoparticles in aqueous solution. As a matter of fact, Turkevich *et al.*^{9,10} were the first ones to demonstrate the possibility of changing the particles size, by controlling the concentration of the reducing agent and the temperature of the reaction.⁹ Since then, their method has been extensively employed, and preferred for involving simple reagents and procedures; however, the products prepared by different laboratories can exhibit distinct spectral and kinetics behaviour, complicating their use as SERS probes. Many authors have been concerned with this problem^{12–15} but at the present time, there are still questions to be answered, requiring further investigation on the mechanisms involved.^{12–15}

In the literature, citrate is reported to play three different key roles, as: reducing agent, surface stabilizing agent and pH mediator.²¹ Accordingly, it has been possible to control the size and shape of AuNP by changing the citrate/gold salt concentration ratio, temperature and stirring rates. For example, S. Biggs *et al.*¹² investigated how the anionic species can influence the surface properties during the AuNPs formation, by using atomic force microscopy (AFM). These authors have

monitored the gold–gold forces during the nucleation process and found out a preferential and more attractive force between gold-citrate, instead of gold-chloride. The work of Xiaohui *et al.*²² showed that by controlling the proportion between citrate and gold salt reagents, the shape of the particles can involve not only spheres, but also wires. The same authors observed that citrate can modify the pH of the system, and hence, the gold complex precursor for the synthesis. In addition, the theoretical work of Ojea-Jiménez *et al.*²³ has shown that pH is another important factor influencing the reaction pathways.

Systematic studies concerning reproducibility aspects have been carried out, including the evaluation of the proper addition of reagents,²⁴ the use of specific glassware²⁴ and calibration curves.²⁶ Pei *et al.*¹⁷ and Liu *et al.*²⁷ observed the formation of chains of gold atoms, instead of spheres, as predicted by Turkevich⁹ in one of the steps of the nanoparticles nucleation and growth. This led to Boon-Kin Pong *et al.*²⁵ to realize that the nucleation and growth mechanism proposed by LaMer²⁷ does not explain how the gold nanoparticles are formed, during the several stages of synthesis and staining. They were able to isolate the steps comprising every change of colour during the particles formation, however, with no guess on the actual mechanism involved.

Based on the kinetic studies encompassing the ion $[\text{AuCl}_4]^-$ in redox processes,²⁴ Ojea-Jiménez *et al.*²⁸ reported a mechanism where the citrate anion replaces chloride in a fast step, forming the corresponding $[\text{AuCl}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)]^-$ complex. After successive rearrangements, a dicarboxyketone intermediary can be formed as the major oxidation product from the citrate ion. The authors also proposed the formation of a complex between the resulting Au(I) species and the dicarboxyketone molecules

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 26077, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: zamarion@iq.usp.br

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4ra12161a

present in solution. Such species are expected to play an important role in the disproportionation of the aurous species and the formation of Au(0) atoms. In addition, Kumar *et al.*³⁹ proposed a kinetic model of nucleation and growth, associated with the dicarboxyketone degradation.

As a matter of fact, in all the studies, dicarboxyketone has been considered an unstable molecule, hard to isolate and detect, particularly at the high temperatures employed in the synthesis. Its decomposition leads to acetone and acetoacetate.^{13,26,39}

In this work, we have focused on the SERS response of the Turkevich nanoparticles generated at a low citrate/gold ratio, aiming the elucidation of the role of the dicarboxyketone species in the synthesis. To our surprise, the dicarboxyketone product generated from the oxidation of the citrate ion, interacted very strongly with the gold nanoparticles, which became greatly stabilized, exhibiting enhanced Raman signals, even in the absence of aggregation. This contrasting behaviour in relation to the citrate stabilized gold nanoparticles, is a completely new aspect, capable of explaining some of the irreproducibility problems associated with the slower ligand exchange kinetics promoted by the strong binding of the dicarboxyketone species. This discovery also raised another important question: How relevant is the chemical mechanism, *i.e.*, how significant should be the interaction between the surface and the molecule to account for large SERS enhancement factors?

Experimental section

Synthesis

All glassware were previously cleaned with aqua regia (3HCl : 1HNO₃), in order to prevent any possible influence of contaminants in the gold reduction process. Two stock solutions have been prepared: a sodium citrate solution (0.038 mol L⁻¹) and a HAuCl₄ solution (5.08 × 10⁻⁴ mol L⁻¹). The syntheses were performed, by starting with 50 mL of gold solution in a 125 mL round bottom flask, and refluxing, using a computer controlled system, for keeping the temperature (±1 °C) and stirring rates constants. The conditions employed for the synthesis were carefully planned, in order to generate nanoparticles of similar sizes (as detailed in the Discussion section). In the case of the synthesis of citrate stabilized gold nanoparticles (cit-AuNP), 1.7 mL of the citrate solution was added at a rate of 100 μL s⁻¹ (2.5 : 1 mol ratio), while the mechanical stirring and temperature were kept constant, at 900 rpm and 100 °C, respectively. In the synthesis of the dicarboxyketone coated nanoparticles, (ket-AuNP), 0.9 mL of citrate ions (1.3 : 1 mol ratio) was added at 1000 μL s⁻¹, and the stirring rates and temperature were kept at 1150 rpm, and 95 °C, respectively. After 30 min, the solutions were cooled to room temperature, and kept in the refrigerator.

Instrumentation

The electronic spectra were recorded on a Hewlett Packard 8453A diode-array spectrophotometer. Raman and SERS spectra

were recorded on an InPhotonics portable instrument, equipped with a diode laser emitting at 785 nm, covering the range of 350–2060 cm⁻¹. A WITec Confocal Raman Microscope, equipped with Ar, Nd:YAG and He-Ne lasers, was used to record the Raman spectra, at 488, 532 and 633 nm respectively. The mass spectra were obtained using a Bruker Daltonics MicroTOF mass spectrometer.

Calculations

Molecular modeling calculations were performed using the *Gaussian 09W* software. The ground state geometries and the vibrational spectra were carried out employing density functional theory (DFT)^{40,41} with B3LYP hybrid functional⁴² (Becke's gradient-corrected exchange correlation⁴³ in conjunction with the Lee–Yang–Parr correlation functional with three parameters⁴⁴). The basis set was 6-311G++(d,p) (scale factor of 0.964 according to the literature^{45,46}). Molecular modeling, vibrational spectra and time-dependent density functional theory (TD-DFT) calculations involving the Au₂₀ cluster^{47–49} was performed using the keyword *gen* employing the BP86 functional with a 6-311G++(d,p) basis set for C, N and H atoms and LANL2DZ for the gold atom, with their relativistic pseudopotential for the inner shell electrons. In the TD-DFT calculations only the singlet excited states were considered. The assignment of the vibrational spectra was carried out using *Gaussview 05* and *Gabedit 2.4.0* softwares.

Results and discussion

Cit-AuNP and ket-AuNP characterization

Considering that the Turkevich method is strongly dependent on the concentration, temperature and stirring rates, a micro-processed system has been specially constructed and programmed (see ESI†), in order to allow a precise control of such variables, and to generate nanoparticles of comparable sizes, in a reproducible way. In this way, the use of slower stirring rates and dropwise addition (100 μL s⁻¹) of citrate were compensated by increasing the amount of this reagent. Conversely, a faster stirring rate was combined with a single addition (1000 μL s⁻¹) of more diluted citrate ions.

In order to evaluate this point, we first investigated the composition of the adsorbed species at the nanoparticles surface by adding 4-mercaptopyridine (mpy, 1 × 10⁻⁴ mol L⁻¹) to the gold nanoparticles, at room temperature. This organic thiol exhibits a great affinity for gold, and is capable of replacing most of the species usually adsorbed at the gold nanoparticles, such as the citrate ion and its derivatives. After centrifugation, the supernatants were analysed by mass spectrometry, as shown in Fig. 1. From the synthesis carried out under nearly stoichiometric proportions, in addition to the mass peak at 190.9 ascribed to citrate ions (Fig. 1a), there was a mass peak at 144.9, which can be unequivocally ascribed to the dicarboxyketone species. In the alternative experiment, using citrate ions in excess, there was no evidence of dicarboxyketone in the mass spectra (Fig. 1b). The particles were then, named as cit-AuNPs

Fig. 1 Mass spectrum of the supernatant of: ket-AuNP (A) and cit-AuNP (B) suspensions, after the surface exchange with 4-Mpy. The mass in 190.9 corresponds to citrate, while the mass in 144.9 corresponds to dicarboxyketo. The mass peak at 111 can be a citrate fragment or some unbound 4-Mpy, which has the same mass (see ESI†).

and ket-AuNPs, with citrate and ketone, respectively, on the surface.

The presence of dicarboxyketo on the surface of AuNPs was really surprising, because, to the best of our knowledge, the SERS response of dicarboxyketo has never been observed before in the classical Turkevich synthesis. Since this species does not survive in the free form at the boiling temperatures employed for the synthesis, its detection implies a stabilizing effect from the gold nanoparticles. Presumably, by carrying out a single addition of the citrate ions, the rapid formation of the gold nanoparticles can provide the necessary support for anchoring the *in situ* generated dicarboxyketo species, leading to the corresponding stabilized particles. In the alternative experiment, by carrying out a drop wise addition of citrate ions, the formation of the gold nanoparticles is retarded in such a way, that most of the freshly generated dicarboxyketo species undergo thermal decomposition before they can bind to the gold nanoparticles.

By working under nearly stoichiometric conditions, the formation of the dicarboxyketo product was expected to be maximized, once all the citrate consumed in the redox reaction

would be converted into product. However, the detection of the free form could be complicated by its intrinsic instability, particularly at the high temperatures employed in the synthesis. Surprisingly, after mixing (at once) the reagents, the resulting nanoparticles, exhibiting the characteristic surface plasmon band at 534 nm (Fig. 2C), was proven very stable, while exhibiting strong SERS signals.

SERS studies

SERS is the most preferred strategy to characterize the surface of plasmonic nanoparticles. A better understanding of how the molecular properties can increase the SERS enhancement factors is of great relevance, particularly for developing more specific molecular probes.

The SERS effect is normally discussed in terms of the electromagnetic (EM), resonance Raman (RR) and charge-transfer (CT) mechanisms. The first one is based on the intensification of the local electric field as a consequence of the coupling between the oscillating electric fields of the incident photons and the surface plasmons. It is usually associated with the presence of the so-called "hot spots" or special regions of enhanced electromagnetic fields in nanostructured surfaces or aggregated nanoparticles. The intensification by the RR mechanism, also referred as SERRS, is related to the enhanced polarizability attained by molecular species as a consequence of the excitation of allowed molecular electronic transitions, under the influence of the electromagnetic radiation and the plasmon field. In the CT mechanism, the covalence degree and charge delocalization on the nanoparticle/molecule system have a direct influence on the SERS effect.

When the molecule-nanoparticle bonding is essentially non-covalent, the metal cluster can only disturb the electronic structure of the adsorbed molecules by means of electrostatic interactions, causing a slight change of polarizability. In contrast, in highly covalent systems, such as those involving thiol-gold bonds, the occurrence of charge-transfer (CT) interactions can become very effective, increasing the SERS effect.

When the three mechanisms (EM, RR, and CT) are involved, the observed SERS effects can be treated as an unified phenomenon and described by an unified theory, as recently

Fig. 2 SEM images of (A) ket-AuNP and (B) cit-AuNP, and (C) their corresponding extinction spectra.

Fig. 3 SERS spectra of non-aggregated ket-AuNPs using different excitation lasers. (A) 785 nm; (B) 633 nm; (C) 532 nm. Integration time of 120 seconds and laser power of 50 mW.

Fig. 4 Keto-enol equilibrium for the dicarboxyketone molecule.

proposed by Lombardi and Birke.^{30,31} In the unified formalism, the polarizability transition moment is given by eqn (1), where the terms in the denominator account for each one of associated mechanisms.

$$R_{\text{IFK}(\omega)} = \frac{\mu_{\text{KI}}\mu_{\text{FK}}h_{\text{IF}}\langle i|Q_{\text{K}}|f\rangle}{\left[\left(\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m\right)^2 + \varepsilon_2^2\right](\omega_{\text{FK}}^2 - \omega^2 + \gamma_{\text{FK}}^2)(\omega_{\text{IK}}^2 - \omega^2 + \gamma_{\text{IK}}^2)} \quad (1)$$

The first one, corresponding to the EM mechanism, includes the dielectric functions of the metallic nanoparticle [$\varepsilon_1(\omega)$ and ε_2] and surrounding chemical environment (ε_m), and

is minimized (*i.e.*, the effect is maximized) at the plasmon resonance band. The second term involves the charge-transfer interactions between the nanoparticle Fermi level (F) and the electronic states (K) of the molecules attached to the surface. The third term accounts for the resonance Raman effect of the adsorbed molecules, and this contribution is maximized when the excitation laser is in resonance with a totally allowed electronic transition involving the ground (I) and an excited (K) molecular state.

The numerator is the product of the transition moments for the adsorbed molecules (μ_{KI}), the nanoparticle-molecule charge-transfer (μ_{FK}), the Herzberg-Teller term $h_{\text{IF}} = \langle I|\partial H/\partial Q|F\rangle$ and the vibrational integral $\langle i|Q_{\text{K}}|f\rangle$, thus defining the selections rules. As pointed out by Lombardi and Birke, these are quite stringent for intensification of a given Raman vibrational mode by SERS effect since implies that all four terms must be nonzero. Furthermore, the oscillating electric field of isolated nanoparticles shows an r^{-3} dependence, where r is distance from the nanosphere centre, so that the effect is essentially confined to the nanoparticle surface. Therefore, only the vibrational modes of molecules located very close to the nanoparticles surface can be significantly coupled with the exciting radiation, and be enhanced.^{31,43}

It should be mentioned that recent theoretical studies are pointing a new, non resonant chemical mechanism (CHEM) for SERS, involving the electronic delocalization and enhanced polarizability in the nanoparticle-ligand system.^{48,52,53} This mechanism arises from relaxation of the molecular electronic structure due to the ground state interactions among the ligand, the metallic surface and the local chemical environment around the molecule.

The SERS spectra of non-aggregated ket-AuNP, recorded at several excitation wavelengths, can be seen in Fig. 3. In general, for spherical nanoparticles, the SERS effect has been associated with the influence of "hot spots", which are located at the confluence region of the nanoparticles plasmon fields in the aggregated systems. Such influence has a dramatic role in the electromagnetic mechanism of SERS and requires a resonance between the exciting radiation and the plasmon resonance band. However, the strong SERS signals observed for the non-aggregated ket-AuNPs departed from this expectation, because of the lack of such local "hot spots". In contrast, under similar conditions, no evidence of SERS effect has been detected for the corresponding cit-AuNPs.

The wavelength dependence of the SERS effect in Fig. 3 shows some contrasting aspects, which cannot be interpreted in terms of a general electromagnetic mechanism. Since the dicarboxyketone species alone are not expected to exhibit electronic bands in the visible region, the contribution of the RR

Table 1 Calculated polarizabilities and the HOMO-LUMO gap for the Au₂₀-enol complex and for the free enol species. The HOMO-LUMO gap is in Hartree

	α_{xx}	α_{yy}	α_{zz}	α_{xx}	α_{yy}	α_{zz}	HOMO-LUMO gap
Au ₂₀ -enol	831.402	3.80	793.458	24.932	30.475	903.733	0.06809
Free enol	113.685	3.960	79.266	2.145	1.119	52.592	0.20473

Fig. 5 (A) Optimized structure (B) representation charge transfer state for the Au₂₀-enol system. The blue surfaces represents where the electrons are coming from and the purple surface represents where they are going. (C) Electronic spectrum calculated by TD-DFT considering only the first three singlet states.

mechanism can promptly be discarded. Therefore, the strong SERS spectra observed at 633 and 785 nm, can only be interpreted in terms of the charge-transfer mechanism, involving excitations in the ket-AuNP system (CT mechanism), or by assuming a non-resonant chemical mechanism, based on the enhanced polarizability expected from ground state interactions between the ligand and the metallic nanoparticles.

As a matter of fact, the dicarboxyketone molecule exhibits HOMO and LUMO levels capable of interacting with the nanoparticles atoms (Fig. S5†), and promoting charge-transfer excitations at the Fermi level. The existence of a keto-enol equilibrium for dicarboxyketone can become particularly relevant in the discussion of the interaction modes with the metal atoms, as indicated in Fig. 4, and on the possible contribution of a chemical mechanism to the SERS effect.

The enol form is expected to coordinate more strongly, because of its delocalized electronic structure and the availability of carbon donor atoms capable of interacting with transition metal ions. Molecular orbital calculations carried out in this work for the dicarboxyketone species, showed that the HOMO level is mainly localized at the carbon atoms from the double bond, while the LUMO is concentrated on the C-O bonds (Fig. S5†).

Therefore, the interaction with the gold atoms may be governed by the frontier orbital involving the C=C bond of the enol form. In fact, theoretical calculations of the Au₂₀-enol structure confirmed the Au-C bond formation *via* the molecular orbital localized on the enol C=C bond (HOMO). However, as a consequence of this interaction, a higher polarizability is also predicted for Au₂₀-enol system, compared with the free molecule (Table 1).

Ground state interactions between the ligand and the metal cluster are rather plausible and occur independently of any excitation in the system. This enhanced polarizability can lead to an enhancement of the Raman scattering by a non resonant chemical mechanism. The enhancement factor can be estimated by the fourth power of the ratio

between the HOMO-LUMO gap in the free molecule and in the Au₂₀-enol system.³³ An approximated enhancement factor of 80 was calculated, and this could be one of the reasons for the high intensity of the Raman scattering measured experimentally. Systems considering pyridine derivatives, N₂, CO, CS and NH₃ as ligand and Ag₂₀ cluster show an enhancement factor for the CHEM mechanism typically less than 50, depending of the substituent in the "para" position of the pyridine ring and the capacity of back-bond formation.³³

The relative high value found for the Au₂₀-enol system indicates a delocalized electronic density due to the presence of the π system in the enol form, contributing to a stronger Au-C bond and leading to an enhanced polarizability. However, in spite of the large number of theoretical attempts to explain the interactions between the adsorbate or ligand, and the metallic clusters^{37–49,53–55} their characteristics are yet not clear, and one cannot easily account for their real contribution to the transition polarizability moment.

Fig. 6 Comparison between SERS spectra of aggregated cit-AuNP (up) and ket-AuNP (down). The ionic strength of both suspensions were increased with the addition of 100 μ L NaCl 1 mol L⁻¹ λ_{exc} = 785 nm.

Table 2 Tentative assignment of ket-AuNP SERS spectrum, based on theoretical Raman spectra of the distorted enol form^a

ket-AuNP SERS	Distorted enol	Assignment
1579	1592	$rC^1=O^{13} + \delta C^1O^{12}H^{13}_{ip}$ $rC^2=O^{15} (vs) + \delta O^{14}H^{10}_{ip}$ $rO^{10}C^1O^{13}_{ass}$ $\delta O^{11}H^{12}_{ip} + rC^5=C^6(w)$
1557	1492	$rC^5=C^6 + 2(\delta O^{11,14}H^{12,10})_{ip}$
	1469	$rC^5=C^6 + rC^8-O^{13} + \delta C^6H^7$ $rC^8-O^{13} + rC^5=C^6 + CH_2scl(w)$
1442		$rC^8=O^{15} (vw) + \delta O^{14}H^{10}$ $CH_2scl + rC^5-C^6 + \delta C^5C^6H^7 + rC^5-C^9$ CH_2scl
1369	1392	$\delta C^2C^6H^7 + CH_2twist$
1271	1345	$\delta O^{11}C^1O^{10} + rC^1-C^2$
	1291	$CH_2wagg + \delta C^5C^6H^7 (vw)$ $2(rC^{1,8}-O^{13,14}) + 2(rC^{1,6}-C^{2,8}) + 2CH_2wagg + \delta O^{14,11}H^{10,12}$
1231		$CH_2wagg + rC^6-C^8 + rC^8-O^{10}$ CH_2twist
1124	1206	$rC^2=O^{11} + rC^5-O^9 + rC^6-C^8 + CH_2twist$
	1145	$\delta C^5C^6H^7 + CH_2twist$
	1122	$\delta O^{11}H^{12}_{op}$
1004		$rC^2-C^5 + 2(rC^{3,8}-O^{9,14}) + CH_2rock(vw)$ $rC^5-C^5 + rC^6-C^8 + CH_2rock$
928	944	$2rC^{3,8}-O^{9,14} + CH_2rock (s)$ $CH_2rock + rC^8-O^{14} + \delta C^2C^3C^6$
855		$rC^1-C^2 + rC^8-O^{14} + rC^1-O^{13} + \delta O^{13}C^1O^{11}$
808	844	$rC^1-C^2 + \delta O^{13}C^1O^{10} + \delta C^2C^3=C^5_{op}$
	768	$\delta long chain_{oph,op}$ $\delta long chain_{ip} + \delta O^{11}H^{12}_{ip} + \delta O^{14}H^{10}_{op}$
	744	$\delta long chain_{iph,op}$
718		$\delta C^6H^7_{op} + \delta ring$ $\delta C^6H^7_{op}$
	680	$\delta long chain_{ip} + \delta O^{12}C^5O^{13}_{ip}$
	662	$\delta O^{14}C^9O^{15}_{ip} + \delta O^{13}C^1O^{11}_{ip} + \delta O^6=C^5C^2_{ip}$
600		$\delta long chain_{op} + CH_2twist$ $2(\delta O^{14,11}C^{9,1}O^{15,13})_{oph}$
	584	$CH_2rock + \delta O^9C^5C_{op} + \delta O^{10}C^1O^{11}_{op}$
	546	$\delta O^{12}C^8O^{13}_{ip} + \delta O^{10}C^1O^{11}_{op}(w)$
508	521	$\delta C^6=C^5C^2C^1_{(op)}$ $CH_2rock + \delta C^6=C^5C^2$ $\delta O^{13}C^8C^6 + \delta O^9C^5=C^6$
	435	$\delta O^{13}C^8C^6_{ip} + \delta O^9C^5=C^6_{ip} + CH_2rock(vw)$ $\delta O^{13}C^1C^2 + \delta O^9C^5-C^2$
380	375	$CH_2rock + \delta C^6=C^5C^2 (w) + \delta C^5=C^6C^8 (vw)$

^a ν = stretching, δ = bending, ip = in plane, op = out-of-plane, iph = in-phase, oph = out-of-phase, sym = symmetric, as = asymmetric.

On the other hand, the CT mechanism depends on the existence of optical excitations between the AuNP and the ligand. According to TD-DFT calculations carried out for this system there is a CT transition in the range of 500 to 800 nm, from the HOMO level, exhibiting significant contribution of the enol C=C double bond, to a triple degenerated LUMO orbital localized in the gold cluster, (Fig. 5 and S9†).

Using the electron density difference method⁵⁶ to highlight the differences in the charge distribution between the ground state and the excited electronic states, one can visualize the electronic changes accompanying the transition. Considering the first three excited states involved in the transition, the charge transfer state shows the electrons moving from the enol π system to the metallic clusters, and a charge reorganization due the intracuster transition.^{56,57}

The charge for the excited states is localized at the cluster tips; for large nanoparticles this phenomena is known as the lightning rod effect and have been proved by discrete dipole approximation (DDA).⁵⁸

In contrast, for the Au₂₀-citrate species, the calculated electronic transitions showed more pronounced charge reorganization involving an intracuster transition, rather than a charge transfer excitation (Fig. S12†). The smaller ligand contribution for the excited state, explains the observed results, explaining the lack of SERS response in the non-aggregated form.

On the other hand, for the ket-AuNPs the theoretical and experimental evidence confirm that the interaction between the enol and the gold surface is governed by the frontier orbital localized at the enol C=C bond, giving rise to a charge-transfer transition. This leads to a more pronounced

enhancement of the SERS signal due the maximization of the CT term in the eqn (1), when the excitation wavelength is 633 or 785 nm.

At 633 nm, although the excitation is in a pre-resonance condition with the AuNP plasmon band, it is in full resonance with the charge-transfer transition, contributing to a large enhancement of the SERS signals (Fig. 5). Therefore, at this wavelength, the simultaneous contribution of the EM, CT and CHEM mechanism is rather plausible. Comparatively, at 785 nm, the SERS signals are not so strong as at 633 nm, since the excitation wavelength departs even more from the AuNP plasmon band, in spite of being in pre-resonance with the expected charge-transfer transition.

At 532 nm, the laser is in resonance with the surface plasmon absorption of the isolated particles but it is far from resonance with the charge-transfer band. In this case, no SERS spectrum has been observed for the ket-AuNP system, indicating that the electromagnetic mechanism is not being effective, due the lack of resonance with the charge transfer transition and high value of the gold imaginary dielectric constant at this wavelength. Therefore, in this work we are showing a unique case of colloidal system, in which the charge transfer contribution is manifesting independently from the EM contribution.

SERS spectra of the aggregated systems

Since the isolated cit-AuNPs do not exhibit significant SERS signals, in order to compare with the ket-AuNP system, it is necessary to promote the nanoparticles aggregation, e.g. by changing the ionic strength. In Fig. 6 one can see the SERS spectra of cit-AuNP and ket-AuNP acquired after aggregating with 1.0 and 1.2 mmol L⁻¹ NaCl. (The extinction spectra were supplied in Fig. S13†.)

For cit-AuNP the interaction between the citrate molecules and the gold surface atoms is predominantly electrostatic, and one cannot expect any observable, low energy molecular or charge-transfer transition. The SERS spectra in this case, can only be observed by inducing the nanoparticles aggregation, in order to generate hot spots and a plasmon-coupling band above 700 nm. However, the SERS spectra of the cit-AuNP aggregated nanoparticles are already well known in the literature¹³ and will not be discussed here.

The EM mechanism becomes relevant in aggregated systems, and generally leads to an enhancement of the spectra as a whole. Therefore, it is not surprising that at 785 nm, the spectral profile (Fig. 6) observed for ket-AuNP was similar to that obtained without aggregation (Fig. 3).

As expected, in the aggregated system, however, the observed intensity was larger than for the isolated nanoparticles, due to the simultaneous contribution of EM, CT and CHEM mechanisms for the SERS effect. For the isolated nanoparticles only the CT and CHEM mechanisms were relevant.

Table 2 shows a comparison between SERS spectrum of ket-AuNPs and theoretical Raman spectrum of dicarboxyketone distorted in one of the carboxylates, Fig. 5. The other forms calculated, including the theoretical Raman spectrum of ketone form and a detailed vibrational analysis, can be found in ESI.†

Ligand exchange kinetics for ket-AuNP and cit-AuNP

Another contrasting aspect between ket-AuNP and cit-AuNP is their kinetics behaviour. As a matter of fact, the chemistry of the metal nanoparticles is essentially controlled by the surface atoms, which exhibit external orbitals available for binding donor-acceptor ligands. Then, in many aspects, there is a similarity between the metal nanoparticles and their metal complexes, allowing to extend the Pearson's hard-soft acid-base principles³⁹⁻⁴¹ and the thermodynamic concepts from the frontier molecular orbitals developed by Klopman.^{42,43}

Therefore, the interaction between the citrate ions and gold surface atoms should be governed by electrostatic interactions, since citrate has a hard-base nature. On the other hand, the coordination of dicarboxyketone should exhibit a greater covalent character. Then, the ligand exchange reaction in aqueous media is expected to be slower in the case of ket-AuNPs than for the cit-AuNPs.

In order to probe the differences in the binding characteristics of the citrate and dicarboxyketone ligands, 4-mercaptopyridine (4-mpy) was employed in the substitution kinetics, because of its strong affinity to gold atoms. As a matter of fact, the addition of an aqueous solution of 4-mpy (pH 6.5) to the

Fig. 7 Exchange ligand experiment showing the replacement of (A) dicarboxyketone and (B) citrate by the 4-mercaptopyridine (4-mpy) ligand. (C) Kinetic curves, monitored by following the plasmon coupling bands during the ligand exchange reaction.

Paper

View Article Online
RSC Advances

gold nanoparticles led to the replacement of the cit and ket ligands, followed by the agglomeration of the products, giving rise to a plasmon coupling band above 700 nm (Fig. 7).

The substitution kinetics for ket-AuNPs was slower than for cit-AuNPs, reflecting a stronger interaction between dicarboxyketone and the gold surface. The plasmon coupling band positions were also quite different in the two cases, e.g. 790 nm for the ket-AuNP and 696 nm for the cit-AuNP, suggesting that the aggregation process is proceeding by distinct pathways.

Conclusions

By controlling the amount and addition rates of citrate ions to the HAuCl_4 solutions, one can generate distinct AuNPs stabilized with citrate or dicarboxyketone species, exhibiting contrasting SERS response and substitution kinetics.

A stronger interaction of dicarboxyketone with the gold surface resulted from the higher electronic delocalization and polarizability in the AuNP-enol complex, enabling a charge-transfer transition between the HOMO (localized in the enol group) and the LUMO (localized at the gold cluster). This contributed to the observed increase in the SERS response for ket-AuNP, in relation to cit-AuNP.

The SERS spectra of ket-AuNP could be obtained even in the absence of aggregation and far from the resonance condition with the plasmon band (e.g. at 785 nm), illustrating an unusual case of enhancement promoted essentially by the CT and the non-resonant Chemical Mechanism.

Acknowledgements

The financial support from FAPESP, CNPq, NAP-NN and PET-ROBRAS is gratefully acknowledged. We thank Dr Meloni, G. N. for his help in building the microprocessed system, which provided a fine temperature control, making the particles synthesis extremely reproducible.

Notes and references

- 1 M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin and R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 801.
- 2 C. J. Murphy, T. K. Sau, A. M. Gole, C. J. Orendorff, J. Gao, L. Gou, S. E. Hunyadi and T. Li, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 13857–13870.
- 3 B. Nikoobakht and M. A. El-Sayed, *Chem. Mater.*, 2003, **15**, 1957–1962.
- 4 R. Jin, Y. Cao, C. A. Mirkin, K. L. Kelly, G. C. Schatz and J. G. Zheng, *Science*, 2001, **294**, 1901–1903.
- 5 M. A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 257–264.
- 6 S. E. Skrabalak, J. Chen, Y. Sun, X. Lu, L. Au, C. M. Cobley and Y. Xia, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 1587–1595.
- 7 J. S. DuChene, W. Niu, J. M. Abendroth, Q. Sun, W. Zhao, F. Huo and W. D. Wei, *Chem. Mater.*, 2013, **25**, 1392–1399.
- 8 J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. Liz-Marzán and P. Mulvaney, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 1870–1901.
- 9 J. Turkevich, P. C. Stevenson and J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, 1951, **11**, 55–75.
- 10 J. Turkevich, P. Stevenson and J. Hillier, *J. Phys. Chem.*, 1953, **57**, 670.
- 11 G. Frens, *Nature Phys. Sci.*, 1973, **241**, 20.
- 12 S. Biggs, P. Mulvaney, C. F. Zukoski and F. Grieser, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 9150–9157.
- 13 C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson and P. C. White, *Langmuir*, 1995, **11**, 3712–3720.
- 14 A. Henglein and M. Giersig, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 9533–9539.
- 15 C. D. Keating, M. D. Musick, M. H. Keefe and M. J. Natan, *J. Chem. Educ.*, 1999, **76**, 949.
- 16 K. R. Brown, D. G. Walter and M. J. Natan, *Chem. Mater.*, 2000, **12**, 306–313.
- 17 L. Pei, K. Mori and M. Adachi, *Langmuir*, 2004, **20**, 7837.
- 18 R. A. Alvarez-Puebla, E. Arceo, P. J. G. Goulet, J. J. Garrido and R. F. Aroca, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 3787–3792.
- 19 J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot and A. Plech, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 15700–15707.
- 20 T. Wang, R. Zheng, X. Hu, L. Zhang and S. Dong, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 14179–14185.
- 21 X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 13939–13948.
- 22 S. Kumar, K. S. Gandhi and R. Kumar, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2007, **46**, 3128–3136.
- 23 B.-K. Pong, H. I. Elim, J.-X. Chong, W. Ji, B. L. Trout and J.-Y. Lee, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 6281.
- 24 V. Soni, R. S. Sindal and R. N. Mehrotra, *Inorg. Chim. Acta*, 2007, **360**, 3141.
- 25 W. Patungwasa and J. H. Hodak, *Mater. Chem. Phys.*, 2008, **108**, 45–54.
- 26 X. Wu, P. L. Redmond, H. Liu, Y. Chen, M. Steigerwald and L. Brus, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 9500.
- 27 Z. Liu, Y. Zu and S. Guo, *Appl. Surf. Sci.*, 2009, **255**, 5827.
- 28 J. Polte, T. T. Ahner, F. Delissen, S. Sokolov, F. Emmerling, A. F. Thünemann and R. Kraehnert, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 1296–1301.
- 29 H. Xia, S. Bai, J. Hartmann and D. Wang, *Langmuir*, 2010, **26**, 3585–3589.
- 30 N. G. Bastús, J. Comenge and V. Puentes, *Langmuir*, 2011, **27**, 11098–11105.
- 31 N. Durante, A. Fortunelli, M. Broyer and M. Stener, *J. Phys. Chem. C*, 2011, 6277–6282.
- 32 C. Li, D. Li, G. Wan, J. Xu and W. Hou, *Nanoscale Res. Lett.*, 2011, **6**, 440.
- 33 I. Ojea-jim, N. G. Bast and V. Puentes, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **2**, 15752.
- 34 A. Volkert, V. Subramaniam and A. J. Haes, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 478.
- 35 I. Ojea-Jiménez and J. M. Campanera, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 23682.
- 36 D. Ghosh, D. Sarkar, A. Girigoswami and N. Chattopadhyay, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2011, **11**, 1141.
- 37 V. K. LaMer and R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 4847.
- 38 I. Ojea-Jime, F. M. Romero, N. G. Bastu and V. Puentes, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 1800.

- 39 S. Kumar, K. S. Gandhi and R. Kumar, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2007, **46**, 3128.
- 40 P. Hohenberg and W. Kohn, *Phys. Rev. B: Solid State*, 1964, **136**, 864.
- 41 W. Kohn and L. J. Sham, *Phys. Rev. B: Solid State*, 1965, **140**, A1133.
- 42 A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1997, **107**, 8554.
- 43 A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648.
- 44 C. Lee, C. Hill and N. Carolina, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 1988, **37**, 785.
- 45 M. P. Andersson and P. Uvdal, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **2**, 2937.
- 46 M. K. Subramanian, P. M. Anbarasan and S. Manimegalai, *Pramana*, 2010, **74**, 845.
- 47 X. Zhao and M. Chen, *J. Raman Spectrosc.*, 2014, **45**, 62–67.
- 48 L. Jensen, L. L. Zhao and G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 4756–4764.
- 49 L. L. Zhao, L. Jensen and G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 2911–2919.
- 50 J. R. Lombardi and R. L. Birke, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 5605–5617.
- 51 J. R. Lombardi and R. L. Birke, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 734–742.
- 52 L. Jensen, C. M. Aikens and G. C. Schatz, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 1061–1073.
- 53 J. E. Moore, S. M. Morton and L. Jensen, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 2470–2475.
- 54 W.-X. Pan, Y.-C. Lai, R.-X. Wang, D.-J. Zhang and J.-H. Zhan, *J. Raman Spectrosc.*, 2014, **45**, 54–61.
- 55 L. L. Zhao, L. Jensen and G. C. Schatz, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 1229–1234.
- 56 J. Luo, P. Wang and Y. Fang, *Vib. Spectrosc.*, 2014, **70**, 162–167.
- 57 R. W. Burgess and V. J. Keast, *J. Phys. Chem. C*, 2014, **118**, 3194–3201.
- 58 W. Hermoso, T. V. Alves, C. C. S. de Oliveira, E. G. Moriya, F. R. Ornellas and P. H. C. Camargo, *Chem. Phys.*, 2013, **423**, 142–150.
- 59 R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 3533–3539.
- 60 R. G. Pearson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1986, **83**, 8440–8441.
- 61 R. G. Parr and R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 7512–7516.
- 62 G. Klopman, *Chem. Phys. Lett.*, 1967, **1**, 200–202.
- 63 G. Klopman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 223–234.