

FILIPPE BENTO MAGALHÃES

**Dispositivos plasmônicos aplicados na intensificação
Raman de biomoléculas**

São Paulo
2022

FILIPPE BENTO MAGALHÃES

**Dispositivos plasmônicos aplicados na intensificação
Raman de biomoléculas**

Edição Revisada

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2022

Nome: MAGALHÃES, Filipe Bento

Título: Dispositivos plasmônicos aplicados na intensificação Raman de biomoléculas.

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr:

Instituição:

Julgamento:

FILIPPE BENTO MAGALHÃES

**Dispositivos plasmônicos aplicados na intensificação
Raman de biomoléculas**

Edição Revisada

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Microeletrônica

Orientador:

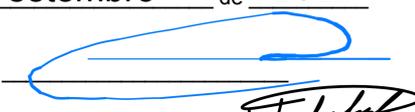
Prof. Dr. Walter Jaimes Salcedo

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 30 de setembro de 2022

Assinatura do autor: 

Assinatura do orientador: 

Catálogo-na-publicação

MAGALHÃES, Filipe Bento

Dispositivos plasmônicos aplicados na intensificação Raman de biomoléculas / F. B. MAGALHÃES -- versão corr. -- São Paulo, 2022.
141 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

1.Sensores biomédicos 2.Espectroscopia Raman 3.Nanopartículas
4.Nanotecnologia 5.Nanoeletrônica I.Universidade de São Paulo. Escola
Politécnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos II.t.

Dedicado à minha filha Laura por
nascer durante o programa de dou-
torado e me presentear com doses
diárias de alegria e amor.

AGRADECIMENTOS

Como mencionar aqui todos os envolvidos nesta realização? São tantos personagens como amigos, professores, técnicos e familiares, todos de fundamental importância e sem os quais eu jamais teria concluído este trabalho. Primeiramente, agradeço a Deus por me dar saúde e me capacitar para superar os obstáculos diários inerentes à pesquisa. Agradeço a Ele também por tudo de bom que aconteceu durante o programa, agradeço também pelos reveses enfrentados, pois eles catalisaram meu amadurecimento.

À minha amada filha Laura, embora tão pequena, foi fundamental por dar um novo sentido a TUDO que faço. Com seu sorriso, a cada manhã renovava minhas forças e me motivava a seguir em frente. Assim que chegou ao mundo, já me encontrou engajado nesta pesquisa. Em inúmeras ocasiões ficou sem a companhia de seu pai, que lhe é de direito, para que este trabalho pudesse ser concluído. Filha, bem-vinda à minha vida e obrigado por todos os nossos momentos juntos.

À minha esposa, Thiani, por estar sempre ao meu lado e por chamar para si todos os deveres cotidianos e inerentes a um lar. Somente assim, tive disponibilidade para dedicar-me à pesquisa. Uma esposa presente nas conquistas e nos momentos difíceis. Sempre me encorajou a superar todos os desafios e situações adversas.

À minha mãe, Marize, por estar presente em todos os anos de minha vida. Agradeço ao meu pai, Vinícius, pelo acesso à educação de qualidade nos níveis fundamental e médio. Ao Vitor e à Izilda pelo apoio familiar. Ao meu tio Valter pelo apoio espiritual. Aos meus primos, Danilo Vasconcelos e Amber Hammond, pelas revisões. Ao meu irmão, Marcos, e a todos os familiares que me incentivaram ao longo do meu curso.

Ao casal Vanderlei Sanches Fernandes e Arlene Duarte. Durante os duros meses da pandemia de COVID-19, quando universidades, laboratórios e escritórios se fecharam, o casal proveu o local ideal para que esta pesquisa fosse concluída. Ao Rafael Felipe Pereira Burilli pelo suporte jurídico fornecido durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Professor Dr. Livre-Docente, orientador e grande amigo, Walter Jaimes Salcedo. Pesquisador incansável, sempre com rigor acadêmico, me ensinou a vencer os desafios da pesquisa com presteza, estratégia e paciência. Um orientador participante e compreensivo que se envolve com as questões de seus orientados e com eles compartilha seu vasto conhecimento. Com muita competência, faz o complexo parecer simples e inspira todos do seu meio a seguirem seus passos.

À Professora Dra., Ruth Flavia Vera Villamil Jaimes, por compartilhar seu conhecimento sobre a síntese de nanopartículas e sobre química. A professora Ruth também auxiliou no acesso aos laboratórios, reagentes, equipamentos e na fabricação das soluções contendo as moléculas estudadas. Assim, ela contribuiu diretamente nos resultados deste estudo. Professora Ruth, muito obrigado.

Ao Professor Dr. Livre-Docente, Ronaldo Domingues Mansano, e ao Dr. Gustavo Marcatti Alexandrino Alves por disponibilizarem o espectrômetro de absorção utilizado neste estudo. Agradeço também às professoras Dra. Márcia Laudelina Arruda Temperini, Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria e Dra. Paola Corio, todas do Instituto de Química

da USP por proverem o espectrômetro Raman e outros instrumentos para análise das amostras. Ao Me. Ricardo Rangel pela oxidação das lâminas de silício.

Aos especialistas em laboratório, Dr. Henrique Estanislau Maldonado Peres, Dr. Wesley Beccaro, Jair Pereira de Souza e Alexandre Tavares Lopes, pois foram muito prestativos em várias situações. Ao Márcio Vale por contribuir com sua experiência em décadas de caracterização do equipamento *Electron-Beam*, sem ela, eu jamais alcançaria a precisão em escala nanométrica durante a fabricação das nanoestruturas. Às técnicas das salas limpas, Cristina, Rita e Tereza por me ensinarem na prática alguns processos da microeletrônica, além de como operar alguns equipamentos. Ao técnico Mário Sanematsu por me elucidar dúvidas sobre a parte prática de processamento de lâminas de silício.

Aos técnicos de oficina: Jair, Raimundo e principalmente ao Pedro pela confecção de porta-amostras e vários utensílios fabricados sob medida utilizados na primeira fase de testes experimentais. Eu os agradeço também pela amizade e apoio durante todo o programa de doutorado.

Aos colegas, Alan, Rina, César e Giordano. Seus conselhos e observações ajudaram a elucidar dúvidas que eu jamais poderia solucionar sozinho. Estas pessoas também me deram muitos momentos de descontração tão necessários na vida de um pesquisador. Emprestaram-me seus ouvidos e ombros e nunca me deixaram só.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento ou número do processo: 88882.333370/2019-01. Este estudo contou também com o apoio do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) Campus Cubatão.

Agradeço a todas as outras pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Obrigado a todos vocês.

“A Fé alcança, a ciência explica, a Verdade liberta.”

-- Filipe Bento Magalhães

RESUMO

MAGALHÃES, F. B. **Dispositivos plasmônicos aplicados na intensificação Raman de biomoléculas.**. Tese (Doutorado em Ciências - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2022).

Desenvolver dispositivos de alta sensibilidade capazes de detectar apenas uma molécula é um grande desafio no segmento de sensores. Complexos processos de fabricação e respostas flutuantes e randômicas são alguns dos obstáculos a serem superados no desenvolvimento deste tipo de sensores. Dispositivos plasmônicos têm apresentado elevada sensibilidade e, portanto, oferecem excelentes perspectivas para o desenvolvimento de sensores ultrasensíveis. Neste trabalho, foram fabricados sistemas plasmônicos baseados em matrizes periódicas de nanocilindros sobre substratos de silício e secção transversal de núcleo de fibra óptica multimodo. A fibra óptica foi aplicada como substrato visando o desenvolvimento de sensores do tipo sonda. As matrizes de nanocilindros de ouro foram fabricadas utilizando-se alumina anódica porosa como máscara mecânica durante a deposição de ouro. As imagens de microscopia eletrônica destas nanoestruturas revelaram matrizes de nanocilindros de ouro organizados em padrão hexagonal. Diferentes diâmetros de nanocilindros foram aplicados na intensificação Raman de moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e da glutatona (GSH). Neste estudo, matrizes de nanocilindros com diâmetro de cerca de 60 nm mostraram alta intensificação SERS comparada com as de nanocilindros de diâmetros maiores e menores. Este comportamento foi totalmente de acordo com os cálculos teóricos e simulações realizadas via FDTD (*Finite-Difference Time-Domain*) de intensificação de campo próximo induzido pelo plasmon de superfície. Os espectros de intensificação Raman (SERS) das moléculas NAD e GSH, revelaram eventos altamente flutuantes e randômicos em função do tempo quando adsorvidas sobre a superfície da matriz de nanocilindros de 60 nm. Resultados similares foram reportados na literatura em sistemas plasmônicos aplicados na detecção de apenas uma única molécula sugerindo que nossas medidas apontam para a detecção de uma única molécula de NAD e GSH. Entretanto, em nosso caso, as linhas Raman apareciam e desapareciam de modo randômico e novos modos vibracionais foram observados. Em outras palavras, as flutuações não ocorreram em linhas Raman correspondentes a modos vibracionais específicos. Esta característica é diferente ao reportado pela literatura onde flutuações espectrais foram observadas somente em modos vibracionais específicos da molécula em análise. No presente trabalho foi proposto um mecanismo para explicar a elevada intensificação SERS e os eventos de flutuações baseado em efeitos de intensificação paramétrica conhecida como mecanismo de ação reversa *back action* entre o plasmon de picocavidades e os modos vibracionais das moléculas em estudo. Em suma, este trabalho apresenta contribuições no processo de fabricação de dispositivos plasmônicos formados por matrizes periódicas de nanocilindros de ouro, e propõe um mecanismo que explica plausivelmente a elevada intensificação SERS e os eventos de flutuações de sistemas plasmônicos aplicados à detecção de uma única molécula.

Palavras-Chave – Superfície de intensificação de espalhamento Raman (SERS), Ressonância plasmônica em superfície localizada (LSPR), Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), Glutatona (GSH), Biossensor.

ABSTRACT

MAGALHÃES, F. B. **Plasmon devices applied to Raman enhancement of biomolecules.** Thesis (Doctor of Science - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2022).

Developing high-sensitivity devices capable of detecting a single molecule has been a major challenge in the sensors area. Complicated fabrication processes and random fluctuations in responses are obstacles to be overcome in this type of sensors. Plasmonic devices have presented high sensibility and, therefore, an excellent prospect in the development of highly sensitive sensors. In this work, plasmonic systems based on periodic arrays of nanocylinder matrices on silicon substrates and on the cross section of silica cores of multimode optical fibers were fabricated. Optical fiber was used as a substrate for application in probe type sensors. The gold nanocylinder matrices were fabricated using porous alumina structures as a mechanical mask during the gold deposition. Scanning electron microscopy (SEM) images of these structures showed arrays of gold nanocylinders with an organized hexagonal pattern. The reflectance spectra result of these structures confirmed the periodic characteristic of the gold nanocylinder matrices. Different diameters of nanocylinders were applied in Raman enhancement of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and glutathione (GSH) molecules. In this work arrays of gold nanocylinders with a diameter of about 60 nm showed higher SERS effects compared to nanocylinders with diameters smaller or larger than this. In the nanocylinders of these structures, this behavior was totally in agreement with the theoretical calculations via FDTD (Finite Difference Time Domain) of the near-field enhancement induced by the surface plasmon. The spectra of Raman enhanced (SERS) of NAD and GSH molecules showed highly fluctuating and random events as a function of time when adsorbed on array of nanocylinders of 60 nm. The SERS spectra of NAD and GSH molecules showed highly fluctuating and random events as a function of time when obtained in 60 nm nanocylinders. Similar results have been reported in the literature on plasmonic systems applied to the detection of only a single molecule. These results suggest that our measurements point to the detection of a single molecule of NAD and GSH. However, in our case, the Raman lines appeared and disappeared randomly, and new vibrational modes were observed. In other words, the fluctuations do not occur in Raman lines corresponding to specific vibrational modes. This characteristic is contrary to that reported in the literature, where fluctuations were observed only in specific vibrational modes of the molecule under analysis. In the present work, a mechanism was proposed to explain the high SERS intensification and the fluctuation events based on parametric intensification effects known as the “back-action” mechanism of reverse action between the picocavity plasmon and the vibrational modes of the molecules under study. Thus, the present work presents contributions in the manufacturing processes of plasmonic devices with periodic structures of gold nanocylinders; and the proposal of a mechanism that plausibly explains the high SERS enhancement and the fluctuation events of plasmonic systems applied to the detection of a single molecule.

Keywords – Surface enhanced Raman scattering (SERS), Localized surface plasmon resonance (LSPR), Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), Glutathione (GSH), Biosensor.

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-IR	<i>2 dimensional Infrared</i>
AAP	<i>Alumina Anódica Porosa</i>
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
EBL	<i>Electron Beam Lithography</i>
EDS	<i>Energy Dispersive x-ray Spectroscopy</i>
FDTD	<i>Finite-Difference Time-Domain</i>
FIB	<i>Focused Ion Beam</i>
GLCM	<i>Gray-Level Co-occurrence Matrix</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IRMPD	<i>Infrared Multiple Photon Dissociation</i>
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
MEV	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Scattering</i>
TE	<i>Transverse electric mode</i>
TIMS	<i>Trapped Ion Mobility Spectrometry</i>
TIMS-MS	<i>Trapped Ion Mobility Spectrometry - Mass Spectrometry</i>
TO	<i>Transverse Optical phonon</i>
TA	<i>Transverse acoustic phonon</i>
TM	<i>Transverse magnetic mode</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Au	Ouro
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
GSH	Glutathiona
Ag	Prata
TiO ₂	Dióxido de titânio
ZnO	Óxido de zinco
CuTe	Liga de cobre e telúrio
h	altura da nanopartícula (nm)
D	diâmetro da nanopartícula (nm)
t _{ox}	espessura do óxido de alumínio (nm)
PMMA	Polimetilmetacrilato
Al ₂ O ₃	Óxido de alumínio
Al	Alumínio
\vec{E}	Vetor campo elétrico
SiO ₂	Dióxido de silício
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HF	Ácido fluorídrico
H ₂ O	Água
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
HCl	Ácido clorídrico
N ₂	Gás nitrogênio
O ₂	Gás oxigênio
Ti	Titânio
λ	comprimento de onda (nm)
T	Intervalo de tempo entre os inícios de duas varreduras consecutivas (s)
Si	Silício
C	Carbono
O	Oxigênio

NAD(P)	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAD ⁺	Forma oxidada da NAD
NADH	Forma reduzida da NAD
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
NMN	Nicotinamida mononucleotídeo
A	Adenina
Nic	Nicotinamida
R1	Ribose próxima à adenina na molécula NAD
R2	Ribose próxima à nicotinamida na molécula NAD
KCl	Cloreto de potássio
I_{max}	Linha Raman de maior intensidade em um conjunto de espectros obtidos nas mesmas condições (unid. arb.)
η	Média GLCM
N_g	Número de tons de cinza da matriz GLCM
$P(i,j)$	Matriz de frequências relativas onde constam células vizinhas, uma com tonalidade i e outra com tonalidade j
σ	Variância GLCM
Γ	Correlação GLCM
$\Delta\nu$	Diferença de número de onda (cm^{-1})
Q	Fator de qualidade de banda de plasmon
\hat{H}	Hamiltoniano total do sistema SERS
\hat{H}_c	Hamiltoniano da cavidade plasmônica
\hat{H}_v	Hamiltoniano vibracional da molécula
\hat{H}_{int}	Hamiltoniano de interação coerente entre os modos plasmônicos e os modos vibracionais da molécula
\hat{H}_L	Hamiltoniano da luz incidente (excitação)
\hat{a}	Operador bosônico de aniquilação associado a \hat{H}_c
\hat{b}	Operador bosônico de aniquilação associado a \hat{H}_v
\hat{a}^\dagger	Operador bosônico de criação associado a \hat{H}_c
\hat{b}^\dagger	Operador bosônico de criação associado a \hat{H}_v
ω_c	Frequência angular de oscilação do plasmon na cavidade
ω_v	Frequência angular dos fônons moleculares

g	parâmetro optomecânico que depende da frequência da cavidade plasmônica e da polarizabilidade Raman da molécula
\hbar	Constante reduzida de Plank ($1,05457 \times 10^{-34} J.s$)
\hat{a}_L	Operador bosônico de aniquilação associado a \hat{H}_L
\hat{a}_L^\dagger	Operador bosônico de criação associado a \hat{H}_L
U	Energia potencial mecânica de atração para moléculas próximas ao <i>hot spot</i>
F	Força gradiente decorrente da existência de U
$\text{Re}(\alpha)$	Parte real da polarizabilidade molecular α de moléculas próximas ao <i>hot spot</i>
A_{eff}	Área efetiva ocupada pelos <i>hot spots</i> dentro da célula unitária
$W(r)$	Densidade de energia eletromagnética em função da posição r
ω	Frequência angular
f_{ahs}	Fração de área ocupada por <i>hot spots</i>
K_B	Constante de Boltzmann ($1,380649 \times 10^{-23} m^2 kgs^{-2} K^{-1}$)
T_K	Temperatura na escala Kelvin
GSSG	dissulfeto de glutatona
NADPH	Forma reduzida da NAD(P)
Pd	Paládio
R	Ribose
str	Vibração em modo <i>stretching</i>
wagg	Vibração em modo <i>wagging</i>
bend	Vibração em modo <i>bending</i>
scis	Vibração em modo <i>scissor</i>
rock	Vibração em modo <i>rock</i>
twist	Vibração em modo <i>twist</i>
sym	Vibração em modo simétrico
asym	Vibração em modo assimétrico
τ	Vibração em modo <i>bending</i> no plano
κ	Torção
ι	Vibração em modo <i>bending</i> fora do plano
\vec{H}	Intensidade de campo magnético
\vec{D}	Campo de deslocamento elétrico (C/m ²)
\vec{B}	Campo de indução magnética (T)
\vec{J}	Densidade de corrente elétrica (A/m ²)

\vec{M}	Vetor de magnetização do meio (V/m ²)
μ	Permeabilidade magnética (H/m)
ε	Permissividade elétrica (F/m)
\hat{P}	Operador momento
m	massa
\hat{X}	Operador posição
$\underline{\hat{P}}$	Operador adimensional momento
$\underline{\hat{X}}$	Operador adimensional posição

SUMÁRIO

1	Introdução	16
1.1	SERS e LSPR	17
1.2	SERS e os desafios para a detecção de uma única molécula	25
1.3	Objetivos	27
1.4	Justificativas	28
2	Fabricação dos dispositivos plasmônicos	29
2.1	Etapas de fabricação de dispositivos com matrizes de nanocilindros sobre lâmina de silício	29
2.1.1	Limpeza inicial com remoção do óxido natural	29
2.1.2	Crescimento térmico do óxido e tratamento hidrofílico da superfície	30
2.1.3	Deposição das membranas de óxido de alumínio sobre substrato de SiO ₂	31
2.1.4	Formação dos nanocilindros: deposição de titânio	33
2.1.5	Formação dos nanocilindros: deposição de ouro	33
2.1.6	Remoção da membrana de óxido de alumínio	33
2.2	Etapas de fabricação de dispositivos com matrizes de nanocilindros sobre ponta de fibra óptica	33
2.3	Etapas de fabricação de dispositivos com nanoesferas sobre lâmina de silício	36
2.4	Técnicas de caracterização e materiais	37
3	Resultados e Discussões	39
3.1	Aglomerados de nanoesferas e matrizes de nanocilindros: caracterizações estrutural e óptica	39
3.2	Aplicação de dispositivos plasmônicos para intensificação Raman da NAD .	51

3.2.1	A importância da NAD	51
3.2.2	Deposição da NAD e sua análise SERS	55
3.2.3	As flutuações SERS com a molécula NAD	60
3.2.4	Espectros SERS da molécula NAD depositadas sobre um arranjo de nanocilindros de Au construídos na seção transversal do núcleo de fibra óptica multimodo.	81
3.3	Aplicação de dispositivos plasmônicos para intensificação Raman da GSH .	83
3.3.1	A importância da GSH	83
3.3.2	Espectros SERS das moléculas de GSH absorvidas na superfície das estruturas plasmônicas de nanocilindros.	87
3.3.3	As flutuações SERS com a molécula GSH	92
4	Conclusões	101
5	Perspectivas Futuras	103
6	Artigo publicado	104
	Referências	105
	Apêndice A – Atribuições das linhas de NAD e GSH obtidas em nanocilindros	126
	Apêndice B – Extração de parâmetros da curva da banda da cavidade plasmônica	133
	Anexo A – Espectroscopia Raman	135
	Anexo B – O método FDTD	137
	Anexo C – Oscilador harmônico quântico	140

1 INTRODUÇÃO

A detecção de biomoléculas é assunto de interesse em vários setores, como saúde, monitoramento ambiental, segurança alimentar e medicina diagnóstica. Identificar e monitorar moléculas que funcionam como biomarcadores clínicos é algo que encoraja o desenvolvimento de novos medicamentos para tratamentos de doenças. Detectar biomarcadores clínicos e conhecer suas concentrações também pode auxiliar na administração de terapias e dietas. Muitos dispositivos e instrumentos estão em desenvolvimento para atender esta demanda, seja para uso em laboratórios, portáteis para aplicação em campo, ou até mesmo dispositivos tipo sonda para análise *in vivo*. Mas para detectar estas moléculas deve haver um princípio de transdução associado que converta o estímulo bioquímico em um sinal eletroquímico, acústico, mecânico, calorimétrico, eletrônico ou óptico, a depender da técnica de detecção escolhida.

Superfícies sensíveis a estímulos químicos destinadas à detecção de biomoléculas tendem à miniaturização por várias razões. Mas quando os elementos estruturais desta superfície se reduzem a algumas unidades de nanômetros, eventos quânticos tornam-se relevantes e as medidas experimentais podem resultar em valores inesperados. Por esta razão, interpretar estes resultados é fundamental para compreender as interações entre as moléculas de teste, a superfície sensível e os instrumentos de análise.

Dispositivos baseados em nanoestruturas de ouro (Au) tem-se mostrado sistemas de elevada sensibilidade com limite de detecção de apenas uma única molécula. O princípio de detecção nestes sistemas relaciona interações entre os modos vibracionais da molécula alvo e os modos plasmônicos induzidos nas nanopartículas de ouro. Este processo é conhecido como intensificação de espalhamento Raman superficial induzido pelos altíssimos campos próximos dos plasmon de superfície (SERS – *Surface Enhanced Raman Scattering*). Outro mecanismo explorado nas nanoestruturas de Au é o efeito de intensificação de fluorescência da molécula alvo. Neste caso, a detecção é através da interação dos momentos de dipolo das transições eletrônicas na molécula com os plasmons localizados das nanoestruturas de Au. Ambos os mecanismos descritos apresentam elevada sensibilidade. No entanto, o efeito SERS fornece informações estruturais da molécula alvo, já que o espalhamento Raman depende de transições eletrônicas e modos vibracionais da molécula.

Uma breve introdução sobre a espectroscopia Raman está disponível no Anexo A. Os efeitos SERS em dispositivos plasmônicos podem ser utilizados na fabricação de sensores de elevada sensibilidade e seletividade ao mesmo tempo, visto que o perfil do espalhamento SERS pode servir como uma impressão digital da molécula alvo. Assim, o presente trabalho apresenta contribuições no processo de fabricação de dispositivos plasmônicos baseados em arranjos periódicos de nanocilindros de Au e sua aplicação no estudo SERS de biomoléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e glutatona (GSH). Os resultados e as contribuições do presente trabalho estão detalhados em quatro capítulos descritos resumidamente a seguir.

Neste capítulo será explicado o que são superfícies com efeito SERS e por que elas intensificam o sinal Raman. Comumente nestas superfícies uma luz incidente interage com nanopartículas onde ocorre a formação de plasmon. Então será vista a contribuição destes efeitos plasmônicos quando são aplicados a dispositivos biossensores, bem como seus limites de detecção e desafios dentro do estado da arte.

No Capítulo 2 será revelado como os dispositivos nanoestruturados do presente trabalho foram fabricados, onde cada etapa será descrita e justificada. Ao final deste capítulo constam as técnicas de caracterização e materiais utilizados para se obter os resultados experimentais.

Os resultados do presente estudo serão apresentados e discutidos no Capítulo 3 que está dividido em três partes: caracterização estrutural e ópticas dos nanocilindros e nanosferas (Seção 3.1), aplicação dos dispositivos fabricados para intensificação Raman das moléculas de NAD (Seção 3.2) e GSH (Seção 3.3). Flutuações espectrais e linhas Raman até então não reportadas foram observadas nos experimentos. Estes resultados foram discutidos com o suporte de modelos associados ao acoplamento paramétrico plasmônico-vibracional quântico.

No Capítulo 4 são apresentadas as conclusões e contribuições obtidas a partir deste estudo. As expectativas apontam para uma nova forma de compreender os fenômenos envolvidos na transdução e abrem possibilidades para o desenvolvimento de biossensores mais sensíveis, versáteis e integráveis.

1.1 SERS e LSPR

Há mais de quarenta anos a SERS se mostra uma importante técnica analítica na ciência dos materiais e em estudos biomédicos (1–3). Superfícies SERS têm sido larga-

mente estudadas (4–9) e são a melhor forma de se obter informações no âmbito molecular (10–14). Esta técnica de alta sensibilidade permite investigar o espectro vibracional de moléculas adsorvidas em superfícies metálicas, além de ser muito vantajosa na análise de amostras aquosas em que a seção transversal de dispersão Raman é muito pequena (15). Na detecção de biomoléculas, a SERS torna possível analisar pequenas áreas de frágeis células e complexas subestruturas celulares (16), como também permite intensificar a fluorescência em ensaios para análise de células (17). Além das ligações moleculares, a intensidade do sinal SERS depende de alguns fatores, como conformação, orientação e distribuição das moléculas sobre o substrato (18–20).

A SERS apresenta vantagens distintas, como a dispensa de reagentes caros ou de um longo tempo em preparação de amostras, como ocorre em outras técnicas, *e.g.*, reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) ou imunoenaios (15). Já em comparação a outras técnicas de análise óptica largamente utilizadas, como detecção por fluorescência e sensibilidade eletroquímica, a SERS tem a vantagem de produzir espectros moleculares únicos como “impressões digitais” e com reduzido fotobranqueamento da área analisada, baixa interferência do *background*, autofluorescência e maior sensibilidade (21–23).

A espectroscopia Raman fornece informações moleculares específicas de uma substância. Por outro lado, nanoestruturas plasmônicas apresentam alta sensibilidade a moléculas devido às suas propriedades ópticas. Assim, a SERS combina a seletividade da espectroscopia Raman com a sensibilidade das nanoestruturas plasmônicas (24, 25). Em SERS, o intenso campo eletromagnético próximo é responsável pela contribuição dominante, já o estímulo químico oferece uma contribuição menor (26).

A origem do efeito SERS está relacionada à intensificação de um campo elétrico local evanescente que é induzido por um plasmon ressonante de superfície localizado em uma partícula conhecido como *hot spot* (8, 9). No local da partícula correspondente ao *hot spot* o campo próximo é intenso. Plasmons de superfície localizados em nanopartículas (LSPR – *localized surface plasmon resonance*) são oscilações coerentes de elétrons livres da nanopartícula presente em uma superfície. Ou seja, os elétrons livres da nanopartícula oscilam de modo coletivo em ressonância com a frequência da luz de excitação. As condições de ressonância são estabelecidas quando a frequência da luz se combina com a frequência natural dos elétrons livres oscilando contra a força de restauração dos íons positivos na nanopartícula. Estes movimentos oscilantes têm a mesma frequência da luz absorvida pelo plasmon. Em outras palavras, a onda eletromagnética se acopla às flutuações de carga do metal e sua energia fica confinada na nanopartícula. A formação do plasmon

implica em transferência de energia da onda eletromagnética para os elétrons livres do metal.

As Figuras 1a e 1b ilustram um esboço simplificado de LSPR em uma nanopartícula metálica. A Figura 1a ilustra a interação no tempo entre o campo elétrico da luz incidente e os elétrons livres de uma nanopartícula, em que os elétrons da nanopartícula oscilam em ressonância com a frequência da onda eletromagnética incidente. Na Figura 1b é mostrado o intenso campo elétrico próximo causado pela diferença de densidade de carga entre os lados de uma nanopartícula quando uma onda eletromagnética provoca oscilação de elétrons livres (27). Na região iluminada onde há a ressonância, o metal absorve e espalha a luz. Este fenômeno foi reportado pela primeira vez por Michael Faraday em 1857 quando ele estudou a coloração de colóides de ouro (28). Portanto, a formação do plasmon depende do tipo de metal, da geometria deste metal, do comprimento de onda da luz incidente, das propriedades dielétricas do metal e do dielétrico, e do ambiente em torno do plasmon (29).

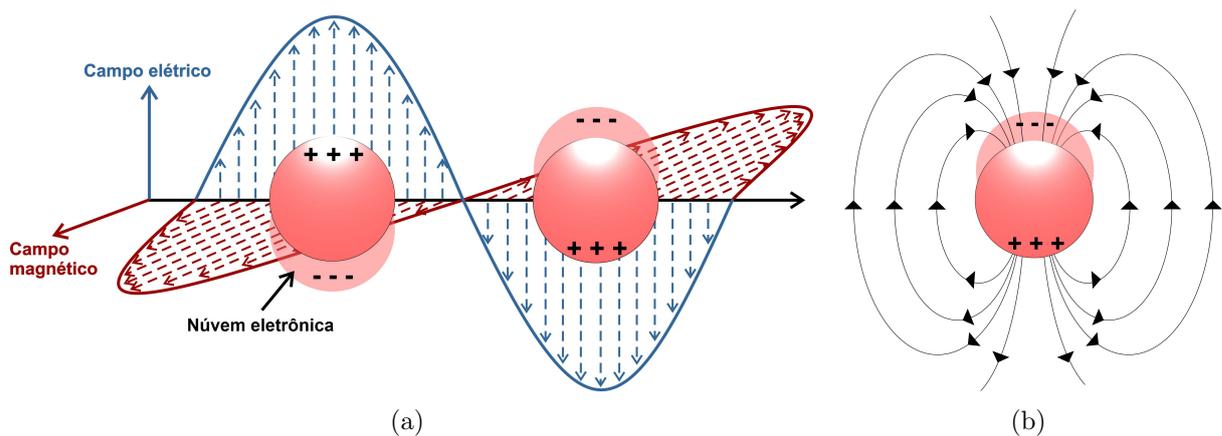


Figura 1 – Plasmon localizado em nanopartícula (LSPR). (a) Evolução temporal dos campos do plasmon em nanopartícula. (b) Campo próximo evanescente gerado pelo plasmon.

Fonte: (27, 30)

A excitação do plasmon responsável pelo efeito SERS normalmente ocorre em nanopartículas de Au e Ag. Isto ocorre porque estes metais têm altos valores negativos da parte real de sua permissividade dielétrica e baixo valor de sua parte imaginária dentro da faixa do espectro visível (31, 32). Au e Ag têm propriedades superiores em termos de intensificação SERS devido às suas características de absorção óptica, *band gap* e raio de excitação de Bohr (33, 34). Alguns ensaios com SERS utilizaram outros materiais como TiO₂, ZnO, grafeno e CuTe. No entanto, a ordem de magnitude da intensificação de sinal Raman destes materiais é fraca (10^2 a 10^4) comparada com plataformas de Au e Ag (10^4 a 10^8) (21, 35–37).

Além do material, a excitação do plasmon responsável pelo efeito SERS depende da geometria das nanopartículas, que na verdade atuam como nanoantenas. Tais geometrias consistem em nanopartículas esféricas (Fig. 2a), nanoconchas (Fig. 2b), nanoanéis (Fig. 2c), nanohastes (Fig. 2d), nanoestrelas (Fig. 2e), dímeros (Fig. 2f), ou partículas de oligômeros (Fig. 2g) (38–55). A intensificação Raman por este mecanismo mostra altos valores de cerca de dez ordens de magnitude (8). Esta enorme intensificação tem mostrado potencial para várias aplicações, como alta sensibilidade de detecção em sistemas analíticos e bioanalíticos, além de mostrar resultados promissores na intensificação de efeitos catalíticos (41, 45, 47, 49, 50, 56, 57).

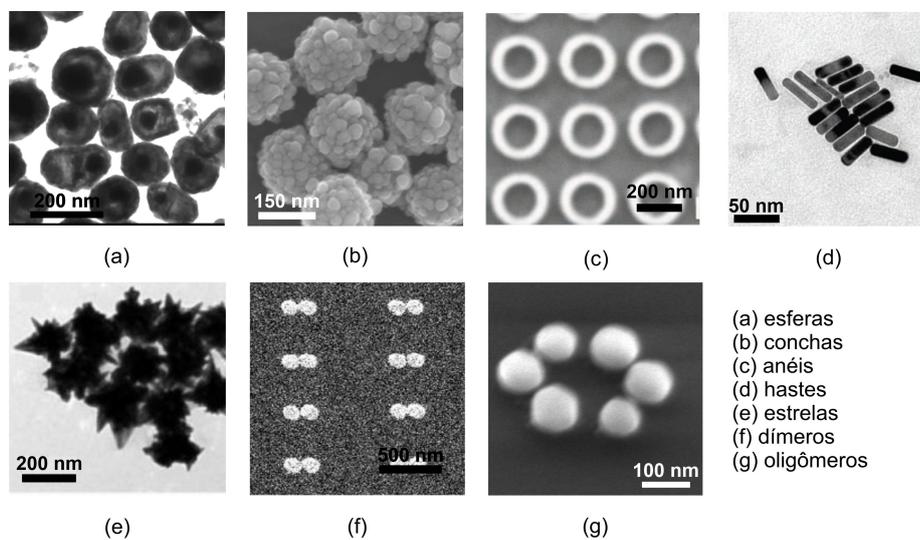


Figura 2 – Exemplos de nanopartículas metálicas dedicadas à formação de plasmon localizado.

Fonte: (40, 43, 46, 48, 50, 53, 55)

Diferentes métodos têm sido utilizados para a fabricação das nanopartículas onde ocorre a LSPR. Quando se deseja melhor controle da morfologia das nanoestruturas fabricadas, os métodos mais utilizados são litografia de feixe de elétrons (EBL - *Electron Beam Lithography*) e feixe focalizado de íons (FIB - *Focused Ion Beam*) devido à alta resolução e controle na fabricação de partículas de diferentes geometrias em escala nanométrica (58, 59). Contudo, estes métodos possuem limitações. Com EBL e FIB é possível fabricar por vez apenas pequenas áreas nanoestruturadas - da ordem de alguns μm^2 - além disso, cada processo é demorado e caro. Áreas excessivamente reduzidas dificultam a caracterização do dispositivo e sua fabricação em larga escala. Na fabricação por EBL um feixe de elétrons grava um padrão em um filme de PMMA (polimetilmetacrilato), este procedimento gera um alto custo de manutenção do equipamento uma vez que reduz a vida útil do filamento de tungstênio do microscópio eletrônico de varredura. Já em FIB, a focalização do feixe de íons é demorada e precisa ser refeita a cada processo.

Por outro lado, quando se deseja fabricar superfícies nanoestruturadas extensas para LSPR, da ordem de mm^2 ou até cm^2 , as técnicas automontadas (*self-assembled*) são mais viáveis (60, 61). Em alguns casos, nanopartículas metálicas são sintetizadas quimicamente em solução e depositadas em superfície por diferentes métodos (62, 63). Outros experimentos mantêm estas nanopartículas dispersas em solução para fazer análises baseadas em LSPR (64). Embora a distribuição das nanopartículas possa ser homogênea em alguns casos, as nanoestruturas fabricadas desta forma possuem limitações, como distribuição desorganizada de nanopartículas e, portanto, baixa reprodutibilidade de distribuição de *hot spots* plasmônicos. Em nanoestruturas construídas sobre substrato, as nanopartículas costumam se agregar umas às outras aleatoriamente em multicamadas e é difícil controlar a formação dos aglomerados. A distribuição desorganizada das nanopartículas também limita o desenvolvimento de modelos capazes de prever o comportamento do plasmon na nanoestrutura.

Algumas aplicações combinam colorimetria com microscopia de campo escuro para analisar a resposta do plasmon diante de um estímulo químico (65). A sensibilidade colorimétrica em geral envolve agregação, acoplamento e distribuição de nanopartículas de Au. Todavia, o modo como estas nanopartículas são distribuídas na superfície depende fortemente da carga da superfície, do tamanho das nanopartículas, da sua concentração na solução e dos solventes envolvidos. E mesmo com todas estas condições satisfeitas, ainda seria essencial um cuidadoso controle da temperatura para se obter alguma reprodutibilidade (66).

Em LSPR é desejável que as nanopartículas estejam isoladas eletricamente entre si. Existe uma técnica de fabricação capaz de atender as principais necessidades de um dispositivo baseado em LSPR com extensa área nanoestruturada, trata-se de moldes de alumina anódica porosa (AAP). No ano de 1953, com o auxílio de um microscópio eletrônico, Keller foi o primeiro a constatar que o Al_2O_3 consiste em um arranjo de células hexagonais de poros organizados (67), atualmente o Al_2O_3 vem sendo aplicado como molde na fabricação de várias nanoestruturas (68). A anodização do alumínio é um processo de formação de um filme de Al_2O_3 sobre o alumínio por meio de sua imersão em um banho eletrolítico em que o metal é ligado ao eletrodo positivo de uma fonte de tensão. Este processo é muito utilizado na indústria para obter camadas protetoras e decorativas em peças e chapas de alumínio (69). Devido à auto-organização dos nanoporos de óxido de alumínio, fácil fabricação e ao reduzido custo do processo de anodização, a AAP mostra-se promissora em sua aplicação em processos de microeletrônica e nanotecnologia. A formação de Al_2O_3 na superfície de um substrato de Al ocorre de modo auto-organizado de colunas hexagonais

com poros circulares ao centro. A camada de Al_2O_3 contém poros paralelos e cilíndricos com diâmetros que variam de 10 nm até várias centenas de nanômetros (70).

Uma forma de se transferir o padrão geométrico de AAP para outro substrato é quando a alumina está em forma de membrana em que os poros são furos passantes. Estas membranas são utilizadas como máscaras em processos de evaporação e deposição de metais (68). O vapor metálico preenche os poros da membrana que é colocada sobre o substrato. Quando a membrana é removida, percebe-se que seu padrão geométrico é transferido para o substrato e são criadas nanopartículas metálicas periódicas (71). Normalmente utiliza-se uma película polimérica ou cerâmica adjacente à membrana para transportá-la do Al a outros substratos (68).

Em 2015, Zhao *et al.* desenvolveram um dispositivo baseado em LSPR usando moldes de AAP como máscara mecânica (72). Como resultado, obtiveram extensas áreas nanoestruturadas de aproximadamente $1,2 \text{ cm}^2$ com nanopartículas de alumínio altamente organizadas. A camada de óxido nativo de Al foi sistematicamente removida por meio de processo químico, e com isso controlou-se o tamanho das nanopartículas que possuíam 50 nm e 66 nm de diâmetro. Então investigou-se o desempenho da ressonância plasmônica de dez alturas diferentes. Foram colhidos espectros de extinção na faixa de 200 nm a 500 nm de comprimento de onda. O resultado da variação do tamanho das nanopartículas por este processo foi um controle preciso do deslocamento para o azul nos espectros de extinção (Fig. 3) (72).

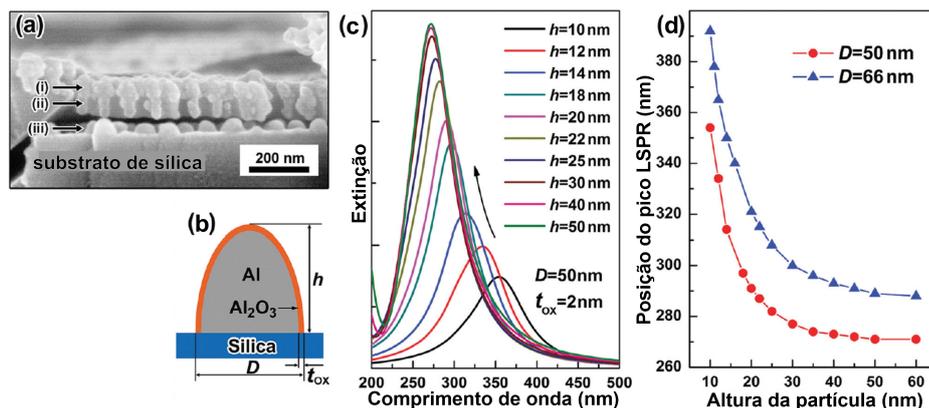


Figura 3 – (a) Imagem MEV de matriz de nanopartículas de Al sobre substrato de sílica através de máscara de AAP, com diâmetro do poro (i), célula (ii) e nanopartícula (iii). (b) Altura (h), diâmetro (D) e espessura do óxido de Al (t_{ox}). (c) Espectros de extinção em função de h . (d) λ do pico LSPR em função de h (72).

Fonte:(72)

Posteriormente, Hao *et al.* desenvolveram um método de fabricação de membranas de AAP em três etapas de corrosão por meio do qual investigou-se sistematicamente a evolução morfológica da AAP durante a corrosão por ácido fosfórico. Como resultado, a

espessura da membrana de AAP pode ser controlada quantitativamente de 100 nm até alguns micrômetros, e o diâmetro dos poros ainda assim pode ser controlado (73).

Todavia, a versatilidade das membranas de AAP não se resume ao controle da espessura, diâmetro dos poros e distância entre eles. Tanto o padrão de distribuição quanto a geometria dos poros podem ser modificados, inclusive com uma distribuição periódica de poros com geometrias diferentes. Lee, Ji, Ross, Gösele e Nielsch pressionaram um nanocarimbo de Ni contra uma superfície de Al, o nanocarimbo era dotado de nanopontas sobressalentes e essa pressão resultou em um recuo do Al nas regiões sob as nanopontas. No processo de anodização, a formação dos poros foi orientada pelas cavidades produzidas com o nanocarimbo (74). Outras aplicações utilizaram o mesmo método posteriormente para fazer poros quadrados, elípticos, buracos em forma de pirâmide invertida e geometrias mistas (75–77). Wen, Xu, Mi e Lei propuseram um conceito para adquirir diversas matrizes binárias nanoestruturadas. A proposta consiste em produzir dois conjuntos diferentes de poros em uma mesma matriz em que as aberturas dos dois conjuntos de poros são por lados diferentes da membrana. Então formou-se plasmon localizado nas nanopartículas de diferentes padrões e isso foi medido em espectros de extinção (Fig. 4) (78).

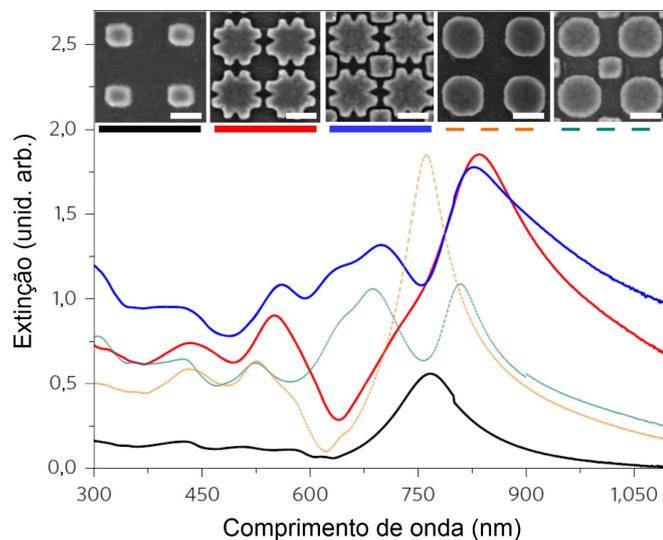


Figura 4 – Espectros de extinção obtidos em diferentes matrizes de nanopartículas de mesma espessura sobre substrato de óxido de índio. Acima são imagens MEV das matrizes cuja barra de escala corresponde a 200 nm (78).

Fonte: (78)

Como já mencionado, a AAP sobre o substrato durante a deposição de metal exerce a função de máscara mecânica, pois os poros são preenchidos por metal e após a remoção da AAP obtém-se nanopartículas com o mesmo diâmetro e distribuição dos poros. Mas se durante a deposição do metal o substrato recoberto pela AAP estiver inclinado em certo ângulo em relação ao alvo, apenas uma fração da área interna do poro será metalizada (Fig.

5). A partir desta ideia, Hao *et al.* construíram dímeros plasmônicos de Ag de diferentes padrões geométricos controlados pelo ângulo de deposição do metal (79). Dentro de cada poro, duas regiões distintas foram recobertas por metal por meio de dois ângulos diferentes de deposição. Assim, foi possível controlar o tamanho das nanopartículas, as distâncias entre elas e matrizes de dímeros foram fabricadas. Em adição, obtiveram-se diferentes padrões de organização combinando-se o ângulo de inclinação com a orientação hexagonal dos poros. Como resultado, o controle dos parâmetros permitiu uma flexível modulação dos modos plasmônicos. O campo próximo formado no espaçamento entre os dímeros foi intenso a ponto de promover espalhamento Raman até quarenta vezes maior do que o plasmon formado em nanopartículas normais (Fig. 5).

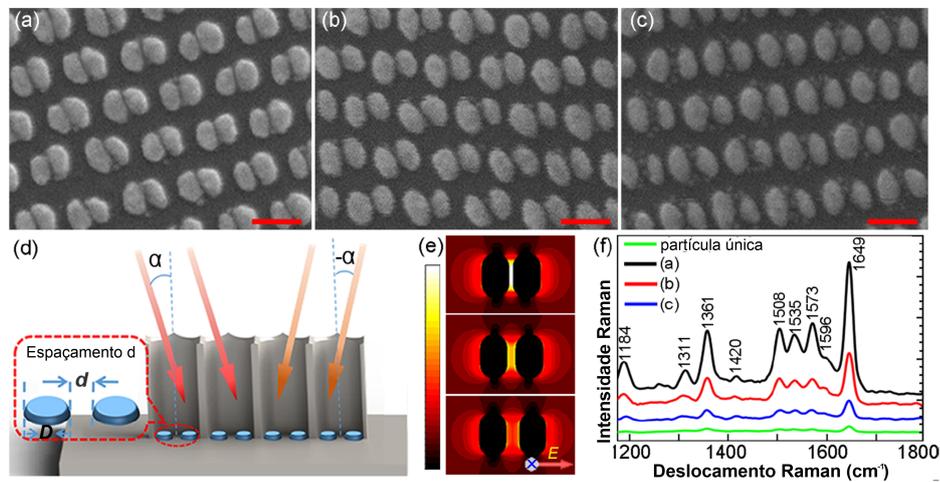


Figura 5 – (a-c) Dímeros espaçados por diferentes distâncias, escala igual a 100 nm. (d) Ilustração da fabricação por controle de ângulo de deposição. (e) Campo elétrico entorno de cada dímero plasmônico. (f) Espectros SERS de rodamina 6G adquiridos em dímeros e em nanopartículas únicas (79).

Fonte: (79)

Wu, Chen, Fang e Yang utilizaram molde de AAP para produzir um substrato de polidimetilsiloxano com superfície nanoestruturada. Foram depositados 80 nm de Ag sobre esta superfície para intensificar o espalhamento Raman em presença de cristal violeta e outras moléculas de teste. Assim, a morfologia assumida pelo substrato polimérico deu à Ag depositada uma geometria periódica semelhante a pétalas, como resultado, concentrações de até 10^{-9} M de cristal violeta foram detectadas (80). Dan, Zhong, Zhu e Wang desenvolveram um novo método para fabricar substratos SERS com nanopilares de prata por processo químico através de moldes AAP. Com estes nanopilares distribuídos periodicamente na superfície, moléculas de rodamina 6G puderam ser detectadas na concentração de 10^{-16} M. Em adição, o substrato pôde ser reutilizado diversas vezes (81).

1.2 SERS e os desafios para a detecção de uma única molécula

A sensibilidade por intensificação Raman pode alcançar o nível de uma única molécula (41, 45, 47). Entretanto, o SERS em detecção de uma molécula apresenta vários desafios. A detecção de uma única molécula foi alcançada apenas com alta intensificação do campo elétrico local confinado em um volume muito pequeno, que é de escala inferior a 1 nm^3 (49, 50). Estruturas SERS altamente eficientes na detecção de uma única molécula envolvem sofisticados processos de fabricação. Por exemplo, nanoantenas em forma de dímeros distantes entre si por algumas unidades de nanômetros (38, 39, 55) e nanopartículas sobre espelhos (82–85).

A detecção de uma única molécula tem se revelado uma medida de baixa repetibilidade (49–52, 54, 86). Mesmo em estruturas SERS cujos processos de fabricação são muito bem controlados, a baixa reprodutibilidade dos espectros ocorre em muitas aplicações, por exemplo, em sistemas analíticos para a detecção de frações moleculares (87, 88). A reprodutibilidade SERS em temperatura ambiente depende de diferentes fatores e alguns são difíceis de serem controlados, como formação das nanoestruturas, morfologia da nanopartícula, interação entre nanopartícula e molécula, e impurezas (89, 90).

O espalhamento Raman é muito sensível aos modos de acoplamento dos plasmons das nanoestruturas e à distribuição de *hot spots* (65, 90). A distribuição homogênea de nanopartículas em uma nanoestrutura é essencial para a reprodutibilidade dos espectros, porém, fabricar nanoestruturas com essa característica é um desafio, especialmente em agregados de nanopartículas. Em superfícies SERS de nanopartículas coloidais, por exemplo, as regiões analisadas dificilmente terão a mesma distribuição de *hot spots* em toda a amostra. Estas diferenças contribuem para a baixa reprodutibilidade do sinal (91, 92). Em nanopartículas metálicas coloidais em soluções aquosas (91–94) a posição de cada nanopartícula muda no tempo e este problema pode ser ainda maior. Isto é um obstáculo para seu uso na análise de biofluidos complexos e, portanto, para aplicações biomédicas (95). Alguns autores têm adotado estratégias para compensar estas diferenças no sinal SERS em soluções aquosas, como o uso de referências internas (92–94, 96), calibrações radiométricas (93) ou o uso de sistemas microfluídicos para tentar controlar o tempo de agregação dos coloides (97).

O espalhamento Raman intensificado por LSPR é extremamente sensível ao tamanho e formato das nanopartículas (90). Variações de tamanho e formato em escala nanométrica podem ser a principal origem da baixa reprodutibilidade - material suplementar de (65).

Fabricar nanopartículas com tamanho, formato e disposição idênticos é um desafio presente no estado da arte da nanotecnologia. A interação entre nanopartícula e molécula, por outro lado, pode envolver transferência de elétron, difusão, mudanças na estrutura molecular ou na estrutura da nanopartícula (98, 99).

A intensificação SERS é determinada pela quantidade de moléculas presentes nos *hot spots*. Em experimentos destinados a detecção de uma única molécula em que a concentração é muito baixa, a densidade de moléculas em cada *hot spot* pode ser diferente, isso diminui a reprodutibilidade (90). Se as moléculas de teste estiverem em uma solução, elas podem se difundir sobre a superfície da nanopartícula, principalmente se tiverem uma fraca afinidade com a superfície da nanoestrutura (90). Em soluções com concentrações muito baixas, esta mobilidade da molécula na superfície da nanopartícula permite que ela entre e saia dos *hot spots*, produzindo flutuações espectrais no tempo (100).

A intensidade das linhas SERS é determinada pela orientação da molécula ao se adsorver à superfície da nanoestrutura. Se o modo vibracional da molécula está perpendicular à superfície, ele será fortemente intensificado pelo campo próximo presente no *hot spot*. Por outro lado, se o modo vibracional estiver paralelo à superfície da nanopartícula, a intensificação deste modo no espectro será mais fraca. Logo, moléculas que mudam de orientação sobre a superfície metálica podem dar origem a flutuações espectrais (101). Algumas moléculas têm a capacidade de mudar de conformação de acordo com o meio onde estão inseridas ou de acordo com a superfície em que estão adsorvidas (102, 103). Devido às flutuações causadas pelo plasmon localizado, moléculas simples com poucos modos vibracionais poderiam promover eventos flutuantes diferentes aos que moléculas com grande número de modos vibracionais apresentam. Diante destas questões e outras discussões abertas nas Seções 3.2 e 3.3, as flutuações SERS oferecem várias oportunidades para o estudo e análise das dinâmicas envolvidas neste fenômeno.

A causa de baixa reprodutibilidade SERS também pode ser atribuída à presença de impurezas ou contaminantes na superfície das nanopartículas. Impurezas oriundas do processo de fabricação da superfície SERS, do processo de deposição da molécula teste ou do manuseio da amostra podem resultar em adsorção de contaminantes à superfície das nanopartículas. Se a molécula contaminante tem forte afinidade com a superfície metálica comparada com a molécula de teste, o espectro SERS observado será basicamente o da molécula contaminante (90). A presença de carbono, oxigênio e enxofre na superfície SERS contribui para a baixa reprodutibilidade do sinal SERS, e a redução da intensidade dos picos é devido ao aumento correspondente da concentração destas impurezas (104). Em experimento com nanopartículas de prata, o aumento da concentração de impurezas

foi associado ao tempo de exposição da superfície ao ar (0h-48h) (104).

No presente trabalho, foi reportada a fabricação de matrizes de nanocilindros de Au. Para esta finalidade, estruturas de alumina com poros organizados foram usadas como máscaras. As nanomatrizes fabricadas mostraram alta intensidade SERS das linhas Raman de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e da glutatona (GSH). Esta estrutura também mostrou eventos flutuantes, como em eventos de detecção de uma única molécula (105). O sistema foi estudado como uma função do laser de excitação e sua potência. Os resultados indicaram um evento altamente não correlacionado ao longo do tempo e das frequências dos modos vibracionais da NAD e da GSH. Estes resultados foram discutidos com uma abordagem relacionada à interação paramétrica de ação reversa dinâmica entre o modo plasmônico e os modos vibracionais. Os resultados sugerem que a alta eficiência SERS e os fenômenos flutuantes foram induzidos pela formação e destruição randômicas de picocavidades sobre a superfície dos nanocilindros. Estas protuberâncias ou picocavidades seriam menores que 2 nm. A SERS tem sido a principal técnica utilizada para estudar a dinâmica da NAD e da GSH relacionada aos seus modos vibracionais (106–109). É a primeira vez que espectros SERS de NAD e GSH apresentam eventos de flutuação em todo o espectro sem qualquer linha persistente.

1.3 Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi fabricar dispositivos plasmônicos baseados em matrizes periódicas de nanocilindros de Au para a detecção das biomoléculas NAD e GSH. Este trabalho teve como desafio a detecção em baixa concentração equivalente à uma única molécula. Com essa finalidade, os dispositivos foram fabricados por meio de um processo simples utilizando membranas de alumina com poros organizados que atuaram como máscaras mecânicas durante a deposição de Au pela técnica *electron beam*. Para aproveitar a tecnologia existente do silício e visando a integração do dispositivo, os nanocilindros foram fabricados sobre lâmina de silício. Com o objetivo de contribuir também no estado da arte de dispositivos tipo sonda para sensoriamento biomolecular, matrizes de nanocilindros organizados também foram construídas na área de secção transversal de núcleo de fibra óptica. Diferentes diâmetros e periodicidades de nanocilindros tiveram suas respostas investigadas para se identificar a geometria de maior sensibilidade.

1.4 Justificativas

Detectar concentrações tão baixas a nível de uma única molécula tem impacto em diversas áreas. Caso a molécula a ser detectada seja um biomarcador, a detecção de uma única molécula pode contribuir, por exemplo, para o diagnóstico precoce e preciso de doenças ou administração de tratamentos. Porém, desenvolver dispositivos de alta sensibilidade capazes de detectar apenas uma única molécula é uma tarefa desafiadora no segmento de sensores. Neste nível de sensibilidade, os dispositivos podem apresentar respostas flutuantes que ainda carecem de uma explicação plausível atualmente. Compreender os mecanismos responsáveis por estas flutuações é o ponto de partida para se interpretar a resposta destes dispositivos de alta sensibilidade.

Dispositivos baseados em plasmon localizado têm apresentado alta sensibilidade e, portanto, oferecem excelentes perspectivas para o desenvolvimento de sensores ultrasensíveis. Se este tipo de dispositivo for aplicado na intensificação Raman de biomoléculas, é possível obter alta sensibilidade e alta seletividade simultaneamente. Biomoléculas como NAD e GSH são encontradas em todos os sistemas biológicos e podem atuar como biomarcadores de doenças como, câncer, mal de Alzheimer e mal de Parkinson. Caso os dispositivos destinados à detecção destas biomoléculas sejam a base de silício, eles também poderão ser integrados e assim tornarão possível o desenvolvimento de novos sensores e analisadores portáteis fabricados em larga escala. No caso de análises *in vivo*, prefere-se utilizar técnicas menos invasivas, sempre que possível. Neste sentido, novos analisadores do tipo sonda podem ser desenvolvidos quando os dispositivos baseados em plasmon localizado são construídos em ponta de fibra óptica, mas os processos de fabricação utilizados (EBL ou FIB) costumam ser caros e demorados (110). Logo, processos de fabricação simples, rápidos e baratos são preferenciais em muitas aplicações.

2 FABRICAÇÃO DOS DISPOSITIVOS PLASMÔNICOS

A lâmina de Si foi termicamente oxidada com o objetivo de formar uma camada de SiO₂ sobre sua superfície e evitar o contato direto do metal com o Si. As matrizes de nanocilindros foram obtidas após a deposição de titânio e ouro sobre máscaras de óxido de alumínio, tais máscaras possuíam poros organizados e foram assentadas sobre a camada de SiO₂. As etapas de fabricação das matrizes de nanocilindros estão indicadas na Seção 2.1. Visando uma contribuição na área de sensores do tipo sonda utilizados em sistemas biológicos, matrizes de nanocilindros de Au também foram fabricadas sobre a área de secção transversal de uma fibra óptica multimodo. O processo de fabricação de matriz de nanocilindros em ponta de fibra óptica segue descrito na Seção 2.2.

Como reportado no Capítulo 1, técnicas de automontagem são amplamente aplicadas para fabricarem-se superfícies SERS para dispositivos baseados em LSPR. Sob a justificativa de se comparar os espectros SERS obtidos nas matrizes de nanocilindros com espectros SERS obtidos em nanoestruturas convencionais, duas amostras com aglomerados de nanoesferas de Au sobre superfície de SiO₂ foram preparadas, onde uma amostra continha esferas de 80 nm de diâmetro e outra com esferas de 40 nm de diâmetro. O método de fabricação das nanoesferas, bem como sua deposição sobre a superfície do substrato seguem descritos na Seção 2.3.

2.1 Etapas de fabricação de dispositivos com matrizes de nanocilindros sobre lâmina de silício

2.1.1 Limpeza inicial com remoção do óxido natural

O substrato dos dispositivos consiste em uma lâmina de silício tipo P $\langle 100 \rangle$ e resistividade de 10-20 $\Omega \cdot \text{cm}$. Antes de tudo, foi necessário aplicar nesta lâmina o conhecido processo de limpeza inicial da microeletrônica. O objetivo desta etapa foi remover eventuais impurezas presentes na superfície da lâmina juntamente com o SiO₂ nativo. A limpeza inicial (ou limpeza completa) seguiu a seguinte receita:

- 5 minutos em água deionizada;
- 15 minutos em H_2SO_4 [98%] : H_2O_2 [38%] (4:1) a 105 °C;
- 5 minutos em água deionizada;
- 1 minuto em HF [49%] : H_2O (1:100) a temperatura ambiente;
- 15 minutos em H_2O : NH_4OH [36%] : H_2O_2 [38%] (5:1:1) a 75 °C;
- 5 minutos em água deionizada;
- 15 minutos em H_2O : HCl [37%] : H_2O_2 [38%] (4:1:1) a 75 °C;
- 5 minutos em água deionizada;
- 1 minuto em HF [49%] : H_2O (1:100) a temperatura ambiente;
- 5 minutos em água deionizada

2.1.2 Crescimento térmico do óxido e tratamento hidrofílico da superfície

No forno de oxidação foram crescidos 75 nm de SiO_2 . A sequência das etapas do processo de oxidação está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Processo de oxidação térmica

Etapa	Duração	Temperatura	Gás utilizado
1	10 minutos	Entrada do forno	N_2
2	5 minutos	1150 °C	N_2
3	22 minutos	1150 °C	O_2
4	10 minutos	1150 °C	N_2
5	10 minutos	Saída do forno	N_2

Fonte: (111)

Após a oxidação térmica, as lâminas de silício foram cortadas em pedaços de 13 mm por 13 mm e nomeadas. Este tamanho reduzido de amostra foi escolhido para facilitar a deposição da membrana, pois verificou-se experimentalmente que áreas pequenas tendem a ter menor densidade de rugas. Também é fundamental que a superfície do óxido esteja limpa e hidrofílica para mitigar a formação de rugas, e dessa forma, aumentar a área de contato entre a membrana e o substrato. Para prover uma superfície limpa e hidrofílica foi necessário remover quaisquer eventuais resíduos orgânicos pouco antes da deposição da membrana. Então aplicou-se o conhecido procedimento de limpeza da microeletrônica:

- 15 minutos em H_2SO_4 [98%] : H_2O_2 [38%] (3:1) a 105 °C;
- 10 minutos em água deionizada;
- 5 minutos em cascatinha;
- 15 minutos em H_2O : NH_4OH [36%] : H_2O_2 [38%] (5:1:1) a 75 °C;
- 10 minutos em água deionizada;
- 5 minutos em cascatinha.

Logo após a limpeza, gotejou-se água na superfície do óxido para certificar-se de que a superfície estivesse hidrofílica. Então a lâmina foi seca com jato de N_2 e seguiu-se para a próxima etapa imediatamente.

2.1.3 Deposição das membranas de óxido de alumínio sobre substrato de SiO_2

As membranas de AAP (Topmembranes Co. Ltd.) foram assentadas sobre a superfície hidrofílica do SiO_2 . O objetivo destas membranas foi servir de máscara mecânica durante o processo de deposição dos metais. As membranas possuem nanoporos com diâmetro e periodicidade bem definidos e estão distribuídos de forma auto-organizada.

Inicialmente as membranas encontram-se sobre um substrato de PMMA [poli(metil metacrilato)]. A transferência da membrana do substrato de PMMA para o substrato de SiO_2 é uma etapa crítica do processo de fabricação e pode deixar resíduos sobre a superfície do SiO_2 . Estes resíduos consistem em PMMA dissolvido em acetona e podem comprometer a aderência do metal a ser depositado e até impedir por completo a formação de nanoestruturas metálicas. Em uma deposição ideal, a superfície não possui resíduos e a membrana não apresenta rugas. Em teoria, quanto maior o número de mergulhos da amostra em acetona limpa menos resíduos de PMMA permaneceriam sobre a superfície. Porém, no presente trabalho também se verificou com o auxílio de um microscópio que a densidade de rugas da membrana aumenta com o número de mergulhos da lâmina em acetona. Em outras palavras, existe certa quantidade de mergulhos e de tempo de imersão da amostra em acetona para prover o melhor resultado em termos de resíduos e densidade de rugas. Em adição, a experiência adquirida em processos de microeletrônica ensina que a acetona pura também deixa resíduo sobre a superfície do SiO_2 , se um metal for depositado nesta superfície, sua aderência também ficará comprometida. Com base nestas observações experimentais, o método de deposição convencional da membrana sofreu

algumas adaptações. Após alguns testes, o processo de deposição da membrana ficou ajustado da seguinte forma:

Procedimento 1 (Topmembranes Co. Ltd.) - A membrana com substrato de PMMA foi fixada sobre a lâmina de silício com o auxílio de uma pinça. Em seguida o substrato de silício com a membrana foi parcialmente imerso em um recipiente com acetona por 30 minutos. Então, o substrato de PMMA foi dissolvido e a membrana de óxido de alumínio ficou em suspensão na acetona. A lâmina de silício foi emergida lentamente inclinada 45° e a membrana foi assentada sobre a superfície do SiO_2 . A amostra secou naturalmente em temperatura ambiente resultando na aderência da membrana sobre a superfície do SiO_2 . Então o substrato foi rotacionado em 180° e imerso novamente por mais 30 minutos seguido de secagem da mesma forma. O substrato seco com a membrana de AAP assentada foi então imerso completamente em um segundo recipiente com acetona limpa por 15 minutos. Novamente a amostra foi emergida e secou naturalmente. O mergulho no segundo recipiente seguido de secagem foi repetido para um terceiro recipiente de acetona limpa. Este é o método convencional para deposição deste tipo de membrana. No entanto, verificou-se por inspeção visual que este procedimento deixava muito resíduo de PMMA na superfície. Por esta razão, foi adicionado um mergulho em um quarto recipiente de acetona limpa por mais 15 minutos.

Procedimento 2 - Remoção de resíduos de acetona. A lâmina foi imersa em um quinto recipiente contendo isopropanol pré-aquecido a aproximadamente 70°C por 15 minutos. Durante a emersão secou-se a amostra com jato de N_2 . Então, todas as amostras foram colocadas em estufa a vácuo por uma hora a 80°C . O objetivo do mergulho em isopropanol foi remover resíduos de acetona e aprimorar a aderência entre o metal a ser depositado e a superfície do SiO_2 . Nos processos convencionais da microeletrônica o isopropanol é aquecido à sua temperatura de ebulição ($\sim 82,5^\circ\text{C}$). Porém, as bolhas da ebulição causariam danos catastróficos à membrana neste caso, por esta razão, a temperatura escolhida foi de 70°C .

Foram utilizadas membranas com diâmetro nominal de poro de 30, 60, 80 e 100 nm com espessura nominal de 120, 200, 200 e 400 nm, respectivamente. É importante mencionar que cerca de 20% da área superficial das lâminas de Si intencionalmente não foi recoberta pelas membranas nesta etapa. O objetivo foi produzir filmes metálicos de mesma espessura e composição dos nanocilindros formados nas etapas 2.1.4 e 2.1.5 para servirem como referência em análises SERS.

2.1.4 Formação dos nanocilindros: deposição de titânio

Depositou-se titânio sobre o SiO_2 pela técnica de feixe de elétrons por meio do equipamento Electro Beam Balzers®. A pressão de base foi de $5,3 \times 10^{-7}$ mBar. A espessura de Ti aproximada depositada foi de 5,05 nm. A taxa de deposição foi tão elevada que não foi possível determiná-la, pois ocorreu em menos de 1 segundo mesmo com o valor mínimo de corrente de deposição permitido pelo equipamento (30 mA). O objetivo desta camada de Ti foi promover aderência entre o SiO_2 e o ouro depositado a seguir.

2.1.5 Formação dos nanocilindros: deposição de ouro

Depositou-se ouro sobre o Ti pela técnica de feixe de elétrons por meio do equipamento Electro Beam Balzers®. A pressão de base foi de $6,1 \times 10^{-7}$ mBar. Na Tabela 3 constam as espessuras de Au depositadas em todas as amostras. A taxa de deposição foi de 2,2 Å/s. O objetivo desta camada foi promover a formação do plasmon durante a posterior análise SERS.

2.1.6 Remoção da membrana de óxido de alumínio

Após a deposição dos metais, removeu-se a membrana de óxido de alumínio. Uma fita adesiva de poliamida foi cuidadosamente colada na superfície onde estava a membrana, ao remover-se a fita observou-se que a membrana fora transferida da lâmina para a fita adesiva, conforme reportado em (112). Ao final do processo desengordurou-se a lâmina com imersão em acetona em ebulição durante 90 minutos seguido de mergulho em isopropanol também em ebulição por mais 10 minutos.

Desta forma, foram fabricadas superfícies com nanocilindros de Au dispostos de modo organizado. As etapas 2.1.1-2.1.6 descritas estão ilustradas na Figura 6.

2.2 Etapas de fabricação de dispositivos com matrizes de nanocilindros sobre ponta de fibra óptica

A fibra óptica (Newport®) utilizada como substrato para a matriz de nanocilindros é do tipo multimodo, com núcleo feito de sílica fundida de $1000 \mu\text{m}$ de diâmetro, e casca de dual acrilato. A fibra óptica teve suas extremidades fixadas em bancada e foi tensionada, então gerou-se um pequeno defeito na parede do núcleo com um bisturi. Com um aumento

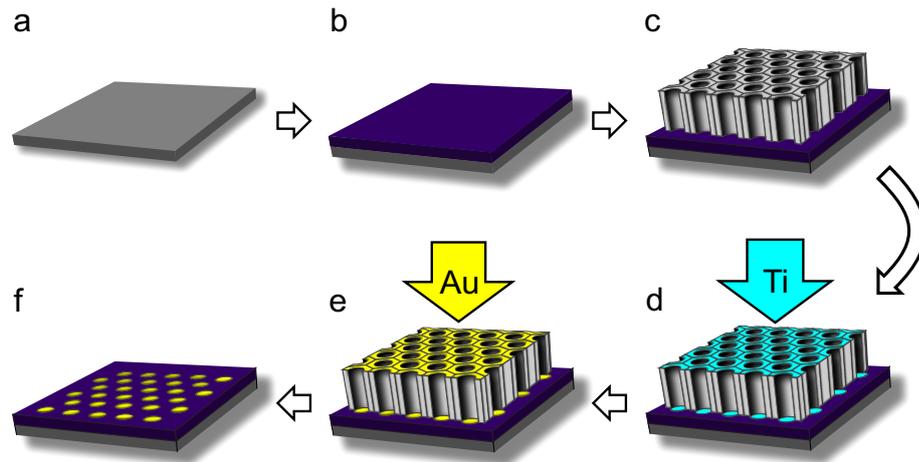
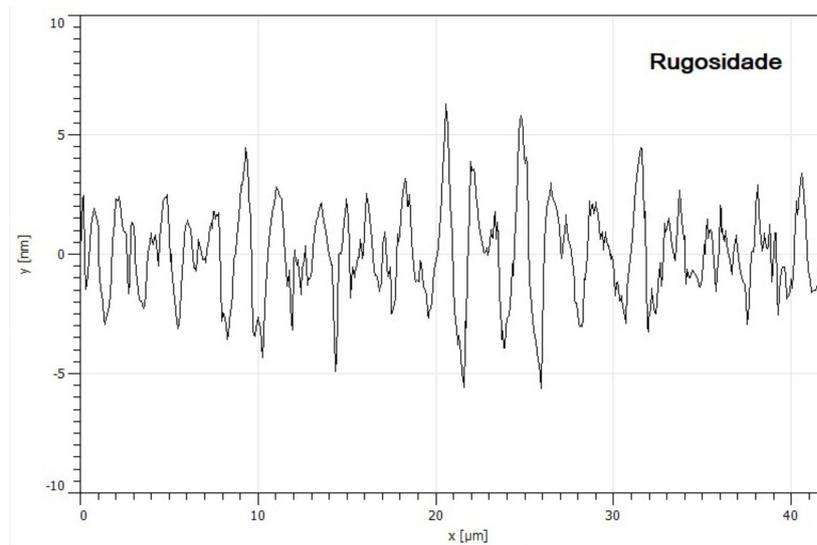


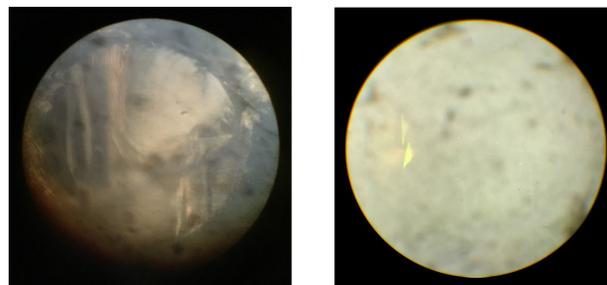
Figura 6 – Ilustração esquemática da fabricação de nanocilindros sobre substrato de SiO₂. (a) Limpeza da lâmina de Si; (b) SiO₂ crescido termicamente; (c) deposição da membrana; deposição de Ti (d) e Au (e) por *electron beam*; (f) nanocilindros organizados depois da remoção da membrana.

abrupto na tensão, a fibra foi clivada de modo transversal no ponto do defeito resultando em uma área de secção transversal com relevo irregular. A ponta clivada da fibra óptica foi polida em água corrente em sete etapas com sete lixas de óxido de alumínio e carbeto de silício. As lixas foram trocadas de acordo com seu tamanho de grão, sempre do maior para o menor na seguinte ordem: 15 μm ; 9 μm ; 5 μm ; 3 μm ; 1 μm ; 300 nm; e 50 nm. Isso resultou em uma superfície de rugosidade com amplitude máxima de ± 7 nm medida em uma distância de 40 μm , como mostra a análise de microscopia de força atômica (Fig. 7a). Esta baixa rugosidade alcançada favoreceu o assentamento da membrana e a fabricação de matrizes de nanocilindros na ponta da fibra óptica multimodo. A Figura 7b retrata a área de secção transversal do núcleo da fibra antes e depois do polimento.

Depois de polida, a ponta da fibra foi limpa e desgordurada com NH₄OH : H₂O₂ (1:1) durante 15 min a 75 °C. Em seguida, a ponta da fibra foi enxaguada por 10 minutos em cascatinha de água deionizada com subsequente secagem em jato de N₂. Então a membrana de AAP com substrato de PMMA foi fixada junto a secção transversal da fibra e parcialmente imersa em acetona por 15 minutos. Com o substrato de PMMA dissolvido e a membrana de AAP agora parcialmente aderida à superfície da fibra óptica, efetuou-se mais três imersões completas sucessivas de 15 minutos cada em outros três recipientes de acetona limpa. A fibra com a membrana já depositada foi mergulhada em isopropanol preaquecido a 70 °C por 15 minutos e cuidadosamente seca com jato de N₂ durante sua emersão. Esta última etapa serviu para remover resíduos de acetona, secar a fibra com membrana com segurança e melhorar a aderência dos metais a serem depositados. A fibra foi levada à câmara de vácuo da evaporadora Electro Beam Balzers® com a superfície do núcleo posicionada perpendicularmente aos alvos de Ti e Au. Finalmente, a deposição



(a)



antes

depois

(b)

Figura 7 – (a) Medida de microscopia de força atômica da rugosidade da área de seção transversal da fibra óptica após o polimento. (b) Fotografias de microscopia óptica da área total de seção transversal do núcleo da fibra antes e depois do polimento, onde o diâmetro do núcleo é igual a $1000 \mu\text{m}$.

dos metais e remoção da membrana seguiram como descrito nas Seções 2.1.4 - 2.1.6 e a fabricação da matriz de nanocilindros de Au na ponta da fibra óptica foi concluída.

2.3 Etapas de fabricação de dispositivos com nanoesferas sobre lâmina de silício

As nanoesferas de 40 nm e 80 nm foram sintetizadas por meio dos métodos descritos em (113–115). A fabricação das nanoesferas seguiu os seguintes passos:

- Uma solução com $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ de HAuCl_4 foi fervida com agitação mecânica.
- 5 ml de uma solução contendo 1 % de citrato de sódio foi adicionado à solução em ebulição com agitação por 10 minutos.
- O aquecimento foi interrompido, mas manteve-se a agitação por mais 15 minutos.
- A agitação mecânica foi interrompida e a solução terminou de esfriar em temperatura ambiente.

Este procedimento foi seguido para obter-se uma solução com nanoesferas de 80 nm de diâmetro e uma solução com nanoesferas de 40 nm de diâmetro. O tamanho das nanoesferas foi definido pela concentração de citrato de sódio na solução. Como já mencionado, soluções contendo nanopartículas metálicas podem ser depositadas em superfície por diversos métodos. Após a secagem do solvente, o resultado são nanopartículas distribuídas na superfície de modo aleatório. No presente estudo optou-se pela secagem em condições ambiente de uma gota da solução sobre a superfície do substrato. Então a preparação das nanoestruturas com nanoesferas de 80 nm e 40 nm seguiu os seguintes passos:

1. Duas lâminas de silício foram limpas, oxidadas e tornadas hidrofílicas conforme método descrito nas Seções 2.1.1-2.1.2.
2. Na superfície de uma das lâminas depositou-se uma gota da solução contendo nanoesferas de Au de 40 nm. Enquanto na superfície da outra lâmina fez-se o mesmo com a solução contendo nanoesferas de 80 nm. Ambas as superfícies permaneceram na horizontal sob condições ambientes de temperatura e pressão e secaram naturalmente por 12 horas.

3. Ao final da secagem das gotas das soluções sobre as superfícies de SiO_2 , as nanopartículas permaneceram aderidas à superfície de SiO_2 em um padrão definido pela dinâmica de evaporação da própria gota. Assim, fabricaram-se duas amostras, uma com nanopartículas de 80 nm e outra com nanopartículas de 40 nm.

2.4 Técnicas de caracterização e materiais

Devido ao intenso campo próximo em SERS, pode-se obter muitas informações estruturais da molécula ligada à superfície. Por esta razão, escolheu-se esta técnica no presente estudo. Um espectrômetro Raman Renishaw InVia-2000 foi utilizado para coletar os espectros das amostras. Ele possui fontes de laser de $\lambda = 532$ nm, de $\lambda = 633$ nm e $\lambda = 785$ nm. A potência do laser foi ajustada por meio de filtros integrados que fracionaram as potências das fontes. Em todos os casos o intervalo entre varreduras (T) foi de 20 s, ou seja, uma nova varredura iniciava a cada intervalo de tempo T . Em cada espectro 1369 pontos foram obtidos. Os casos em que estes valores foram alterados estão devidamente indicados no texto a seguir. Utilizou-se uma lente objetiva de $50\times$ nas análises SERS, com aberturas numéricas de 0,75 para lâminas de silício e 0,53 para fibra óptica. Os espectros Raman foram adquiridos em modo de varredura (*scan*). No início de cada dia de ensaio o equipamento foi devidamente calibrado com silício e aguardou-se mais de 15 minutos para a estabilização da fonte de laser. Todas as medidas SERS foram executadas em condições ambientes de temperatura e pressão. As linhas de base dos espectros foram calculadas por suavização assimétrica de mínimos quadrados. Este modelo é muito aplicado atualmente em espectros SERS para a remoção do sinal de fundo (116, 117). Esta ferramenta encontra-se disponível no software Origin Pro®2020, utilizado para fazer os gráficos do presente estudo. Nos espectros que apresentaram saturação do detector em alguma frequência, as linhas de base foram traçadas manualmente e a faixa com saturação foi descartada.

Algumas amostras sem molécula depositada foram utilizadas para caracterização óptica e estrutural. A caracterização óptica foi obtida por técnica de reflectância por meio de um espectrômetro da marca Ocean Optics, modelo USB-4000. Este equipamento dispõe de um software dedicado, uma fonte de luz branca e um cabo com múltiplas fibras ópticas para iluminar uma região da amostra e coletar a luz refletida.

Após a fabricação das nanoestruturas foi realizada a caracterização estrutural. Então foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de todas as amostras. O microscópio eletrônico de varredura é da marca FEI Company, modelo Inspect-

F50 dotado de espectrômetro de raio x de energia dispersiva (EDS - *Energy Dispersive x-ray Spectroscopy*). Os valores dos parâmetros nos quais cada imagem MEV foi obtida encontram-se na parte inferior de cada imagem. Todas as amostras foram ao MEV sem metalização para escoamento de elétrons incidentes, visto que isso poderia descaracterizar as nanopartículas devido à reduzida espessura dos nanocilindros.

Todas as etapas de fabricação dos dispositivos reportadas nas Seções 2.1, 2.2 e 2.3, bem como as caracterizações por espectroscopia de reflectância (Figs. 20a e 20b), microscopia de força atômica e microscopia óptica (Fig. 7a e 7b) foram realizadas nas salas limpas do Laboratório de Microeletrônica (LME) e do Laboratório de Sistemas Integráveis (LSI), ambos localizados no Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade de São Paulo. As imagens de MEV e espectros EDS foram obtidos no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. E as medidas de espectroscopia Raman e SERS foram realizadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados foram separados em três partes neste capítulo. Na primeira parte (Seção 3.1) é descrito a caracterização estrutural por meio de imagens de microscopia eletrônica, espectros EDS e medidas de espessura por sensor de quartzo integrado à câmara de evaporação. O objetivo foi verificar a morfologia e composição das nanoestruturas e nanopartículas. A caracterização óptica também foi efetuada e espectros de reflectância foram obtidos. Na segunda parte (Seção 3.2) será apresentada a primeira molécula de teste utilizada, a NAD. Nesta parte serão descritos o método de deposição da NAD e sua análise SERS, e então as flutuações das linhas Raman referentes à NAD serão mostradas e discutidas. Na terceira e última parte deste capítulo (Seção 3.3) a segunda molécula de teste, a GSH, será apresentada, bem como o método de deposição aplicado e sua análise SERS, e então as flutuações das linhas Raman correspondente à GSH serão apresentadas e discutidas.

3.1 Aglomerados de nanoesferas e matrizes de nanocilindros: caracterizações estrutural e óptica

Nas Figuras 8 e 9 são mostradas as imagens de MEV e espectros EDS das amostras de lâmina de silício com nanoesferas de 80 nm e 40 nm, respectivamente. Os espectros EDS foram obtidos em dois locais distintos, um espectro EDS corresponde a uma região com nanopartículas visíveis (Fig. 8d) e outro corresponde a interstícios entre os aglomerados (regiões escuras) (Fig. 8e). A tensão de aceleração de elétrons destes espectros EDS foi de 10 kV.

Com aumento de vinte e cinco mil vezes, verifica-se que as nanoesferas de 80 nm formaram uma camada homogênea, porém, desorganizada (Fig. 8a). Em duzentas mil vezes fica claro que a disposição das nanoesferas é caótica e há multicamadas de *clusters* sem forma definida (Fig. 8b). Selecionou-se um ponto sobre um *cluster* de nanoesferas de 80 nm e um ponto sobre uma região escura (Fig. 8c) para verificar a composição por meio de espectros EDS nas Figuras 8d e 8e, respectivamente. Em um interstício (Fig. 8e) a quantidade de Au é cerca de 83% da quantidade de Au de um aglomerado de

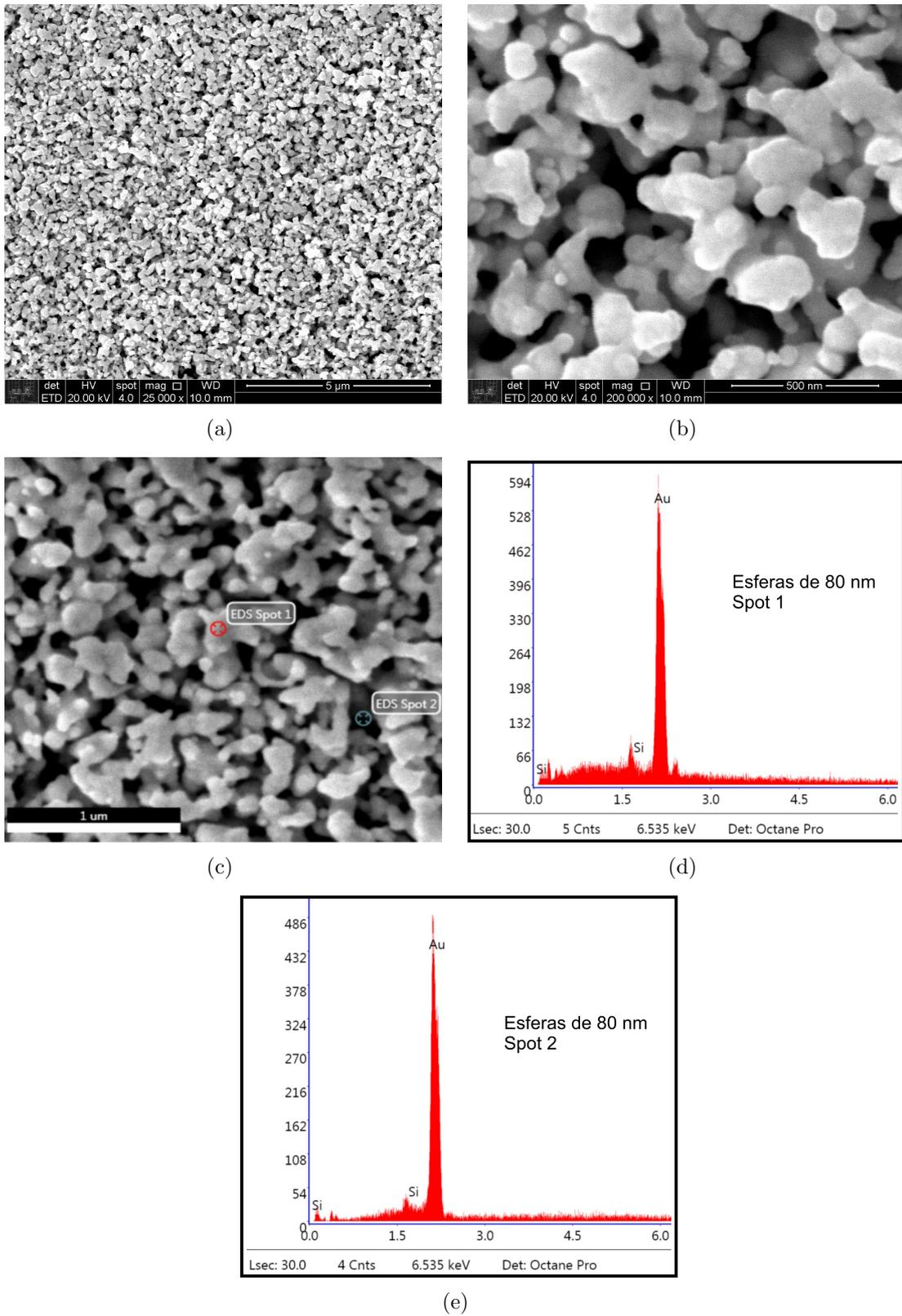


Figura 8 – Imagens de MEV e espectros EDS de filme fino de nanoesferas de 80 nm depositadas sobre substrato de SiO_2/Si .

nanoesferas (Fig. 8d). Logo, há nanoesferas também dentro dos interstícios e é provável que esta estrutura seja formada por multicamadas de aglomerados ramificados. O mesmo procedimento foi realizado para a amostra com nanoesferas de 40 nm de diâmetro (Fig. 9).

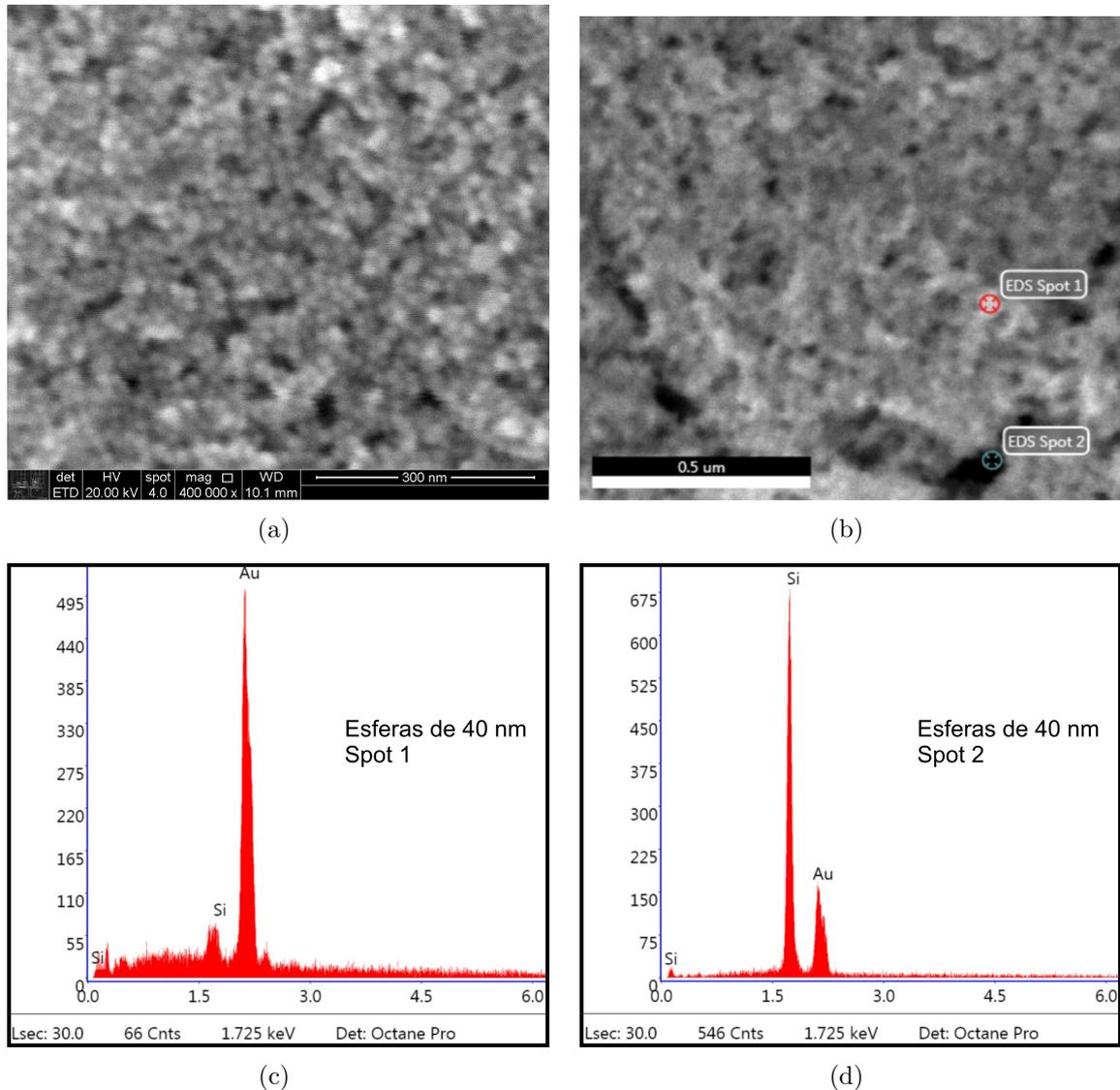


Figura 9 – Imagens de MEV e espectros EDS de filme fino de nanoesferas de 40 nm depositadas sobre substrato de SiO_2/Si .

Na Figura 9a é possível identificar aglomerados de esferas de 40 nm (ou menos) com alguns pontos escuros. Estas nanoesferas também estão dispostas de modo desordenado, porém, em um padrão diferente das nanoesferas de 80 nm. Um ponto com nanoesferas e um ponto escuro foram selecionados (Fig. 9b) para a aquisição de espectros EDS. Assim como em nanoesferas de 80 nm, em esferas de 40 nm foram identificados Au e Si nas nanoesferas (Fig. 9c). Contudo, no interstício o Si foi predominante (Fig. 9d). Isso é um indicativo de que nesta amostra a cobertura formada pelas esferas de 40 nm é mais fina

comparada com a formada pelas esferas de 80 nm.

As estruturas fabricadas com membranas de alumina anódica porosa sobre lâmina de silício também foram caracterizadas. Nas Figuras 10a e 10b constam imagens MEV em perspectiva e de topo dos nanocilindros fabricados, respectivamente.

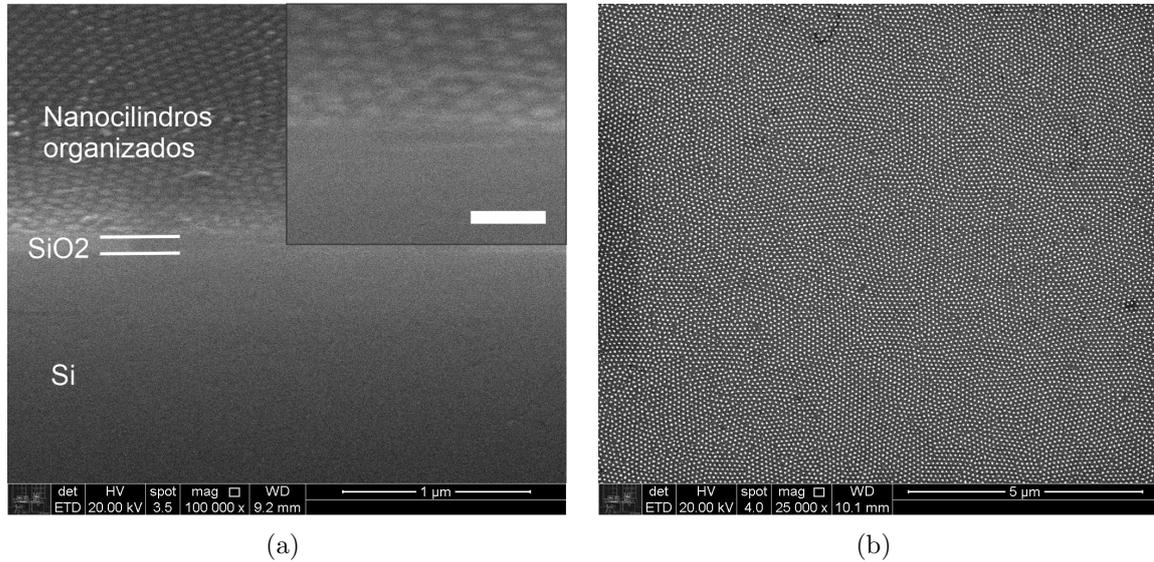


Figura 10 – Imagem em perspectiva (a) e de topo (b). A barra de escala na figura menor (a) representa 200 nm.

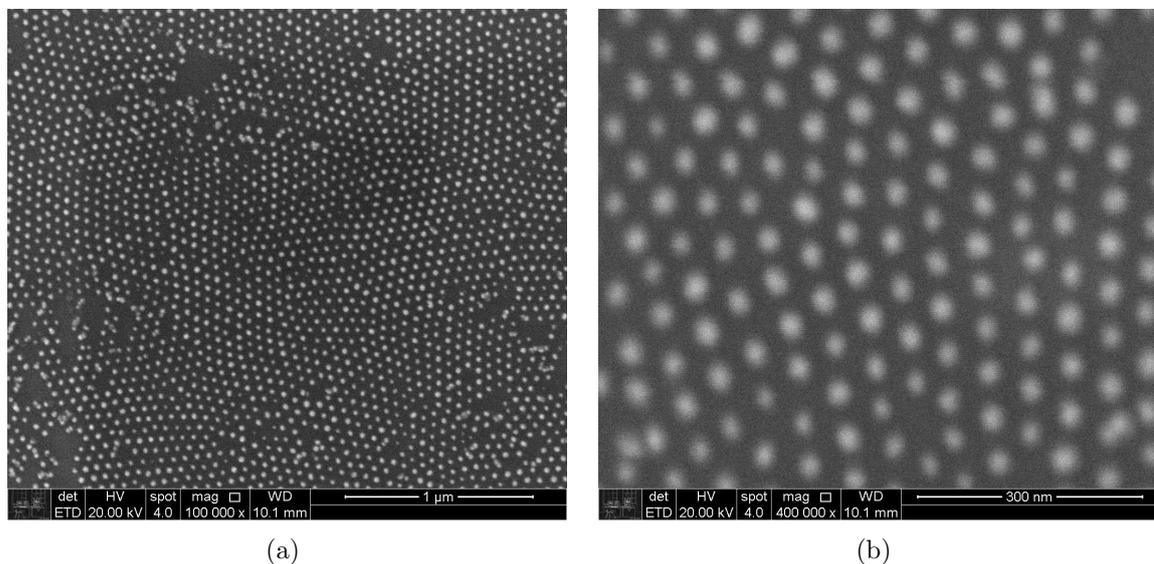


Figura 11 – Amostra A com nanocilindros organizados de 30 nm de diâmetro efetivo em aumento de 100.000× (a) e 400.000× (b).

Na Figura 10 as formas circulares claras consistem em nanocilindros de Au com indicação da camada de SiO₂ sobre substrato de Si (10a) e imagem de topo (10b). As Figuras 11-17 mostram as imagens MEV correspondentes às amostras A-G, respectivamente. Para cada amostra obtiveram-se uma imagem com aumentos de 50.000×-100.000×

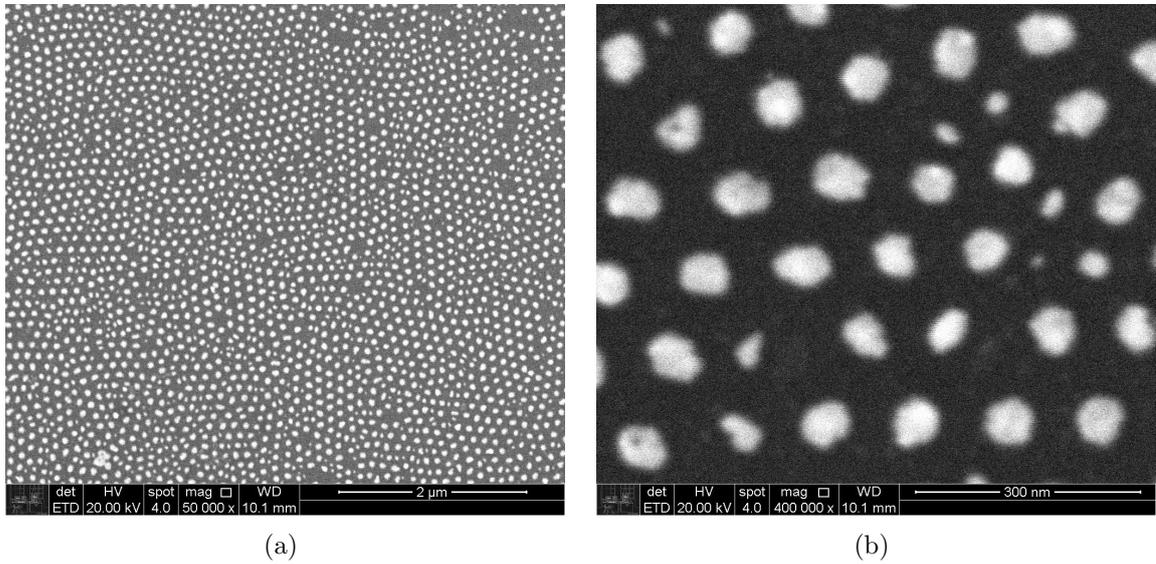


Figura 12 – Amostra B com nanocilindros organizados de 63 nm de diâmetro efetivo em aumento de $50.000\times$ (a) e $400.000\times$ (b).

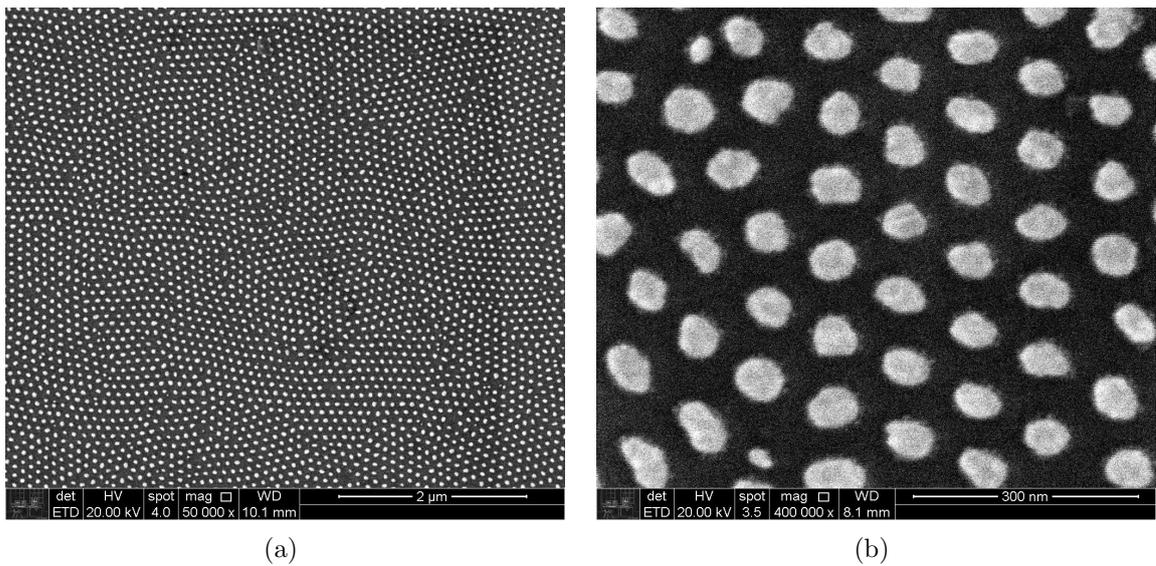


Figura 13 – Amostra C com nanocilindros organizados de 78 nm de diâmetro efetivo em aumento de $50.000\times$ (a) e $400.000\times$ (b).

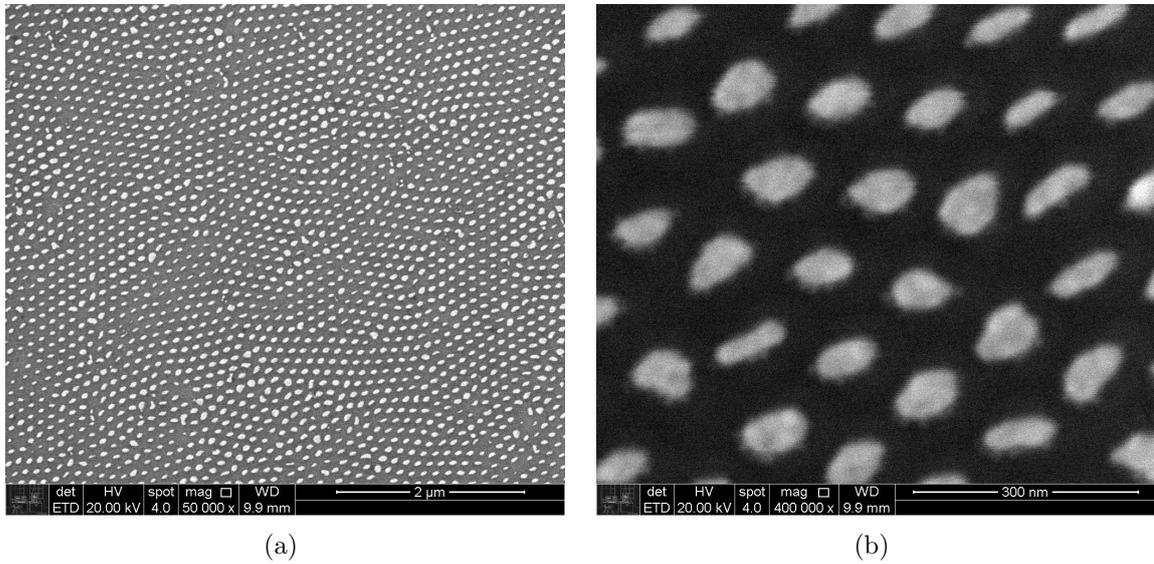


Figura 14 – Amostra D com nanocilindros organizados de 98 nm de diâmetro efetivo em aumento de $50.000\times$ (a) e $400.000\times$ (b).

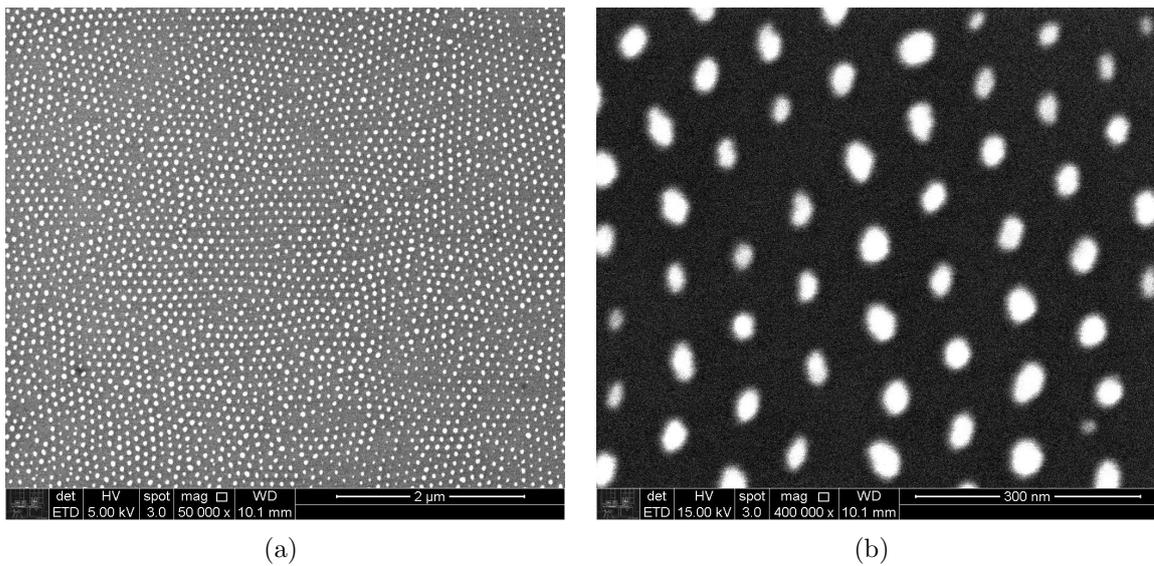


Figura 15 – Amostra E com nanocilindros organizados de 31 nm de diâmetro efetivo em aumento de $50.000\times$ (a) e $400.000\times$ (b).

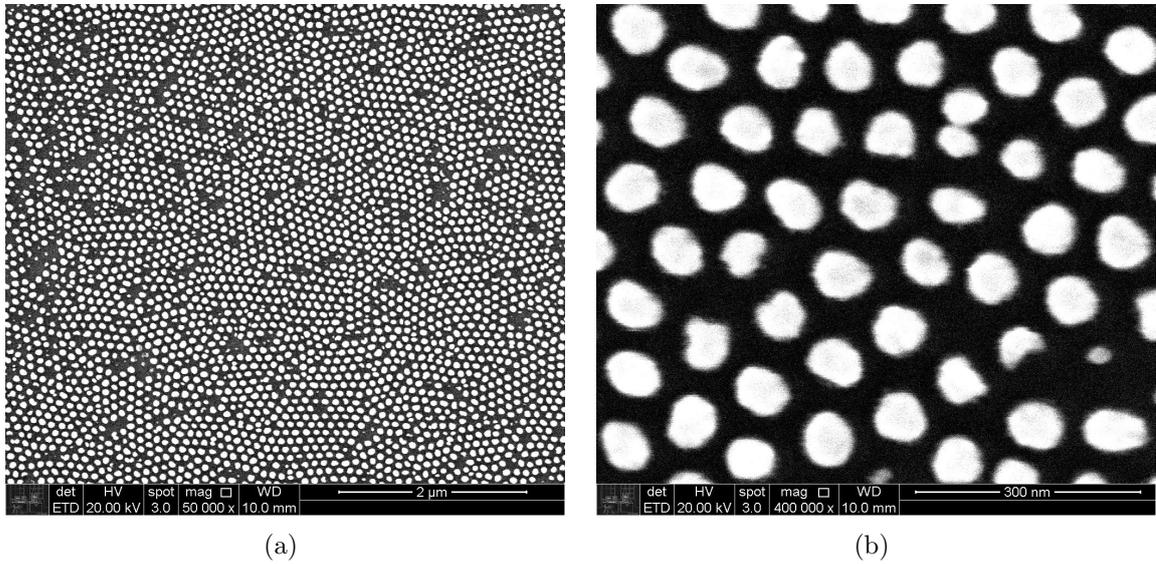


Figura 16 – Amostra F com nanocilindros organizados de 58 nm de diâmetro efetivo em aumento de $50.000\times$ (a) e $400.000\times$ (b).

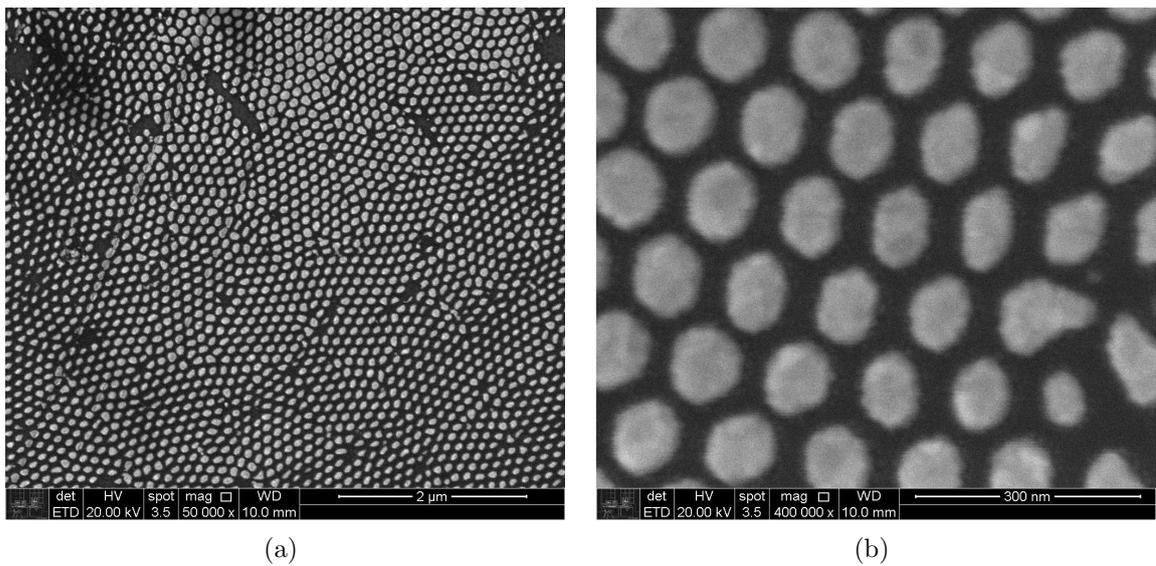


Figura 17 – Amostra G com nanocilindros organizados de 84 nm de diâmetro efetivo em aumento de $50.000\times$ (a) e $400.000\times$ (b).

(a) e uma com aumento de $400.000\times$ (b). As imagens MEV mostram que em todos os casos os arranjos dos nanocilindros seguem uma simetria de uma rede hexagonal compacta (2D) como esperado, já que todos os filmes de alumina porosa utilizados como máscara possuem uma distribuição hexagonal compacta de seus poros.

As estruturas fabricadas com membranas de alumina anódica porosa sobre pontas de fibra óptica também foram caracterizadas. A Figura 18a do interior do microscópio eletrônico retrata o posicionamento vertical do segmento de fibra óptica cuja ponta da superfície está perpendicular ao feixe de elétrons. A Figura 18b é a imagem MEV de topo da ponta da fibra óptica analisada. As Figuras 18c e 18d são as imagens MEV da matriz de nanocilindros fabricada na ponta da fibra óptica, com aumento de $50.000\times$ e $400.000\times$, respectivamente.

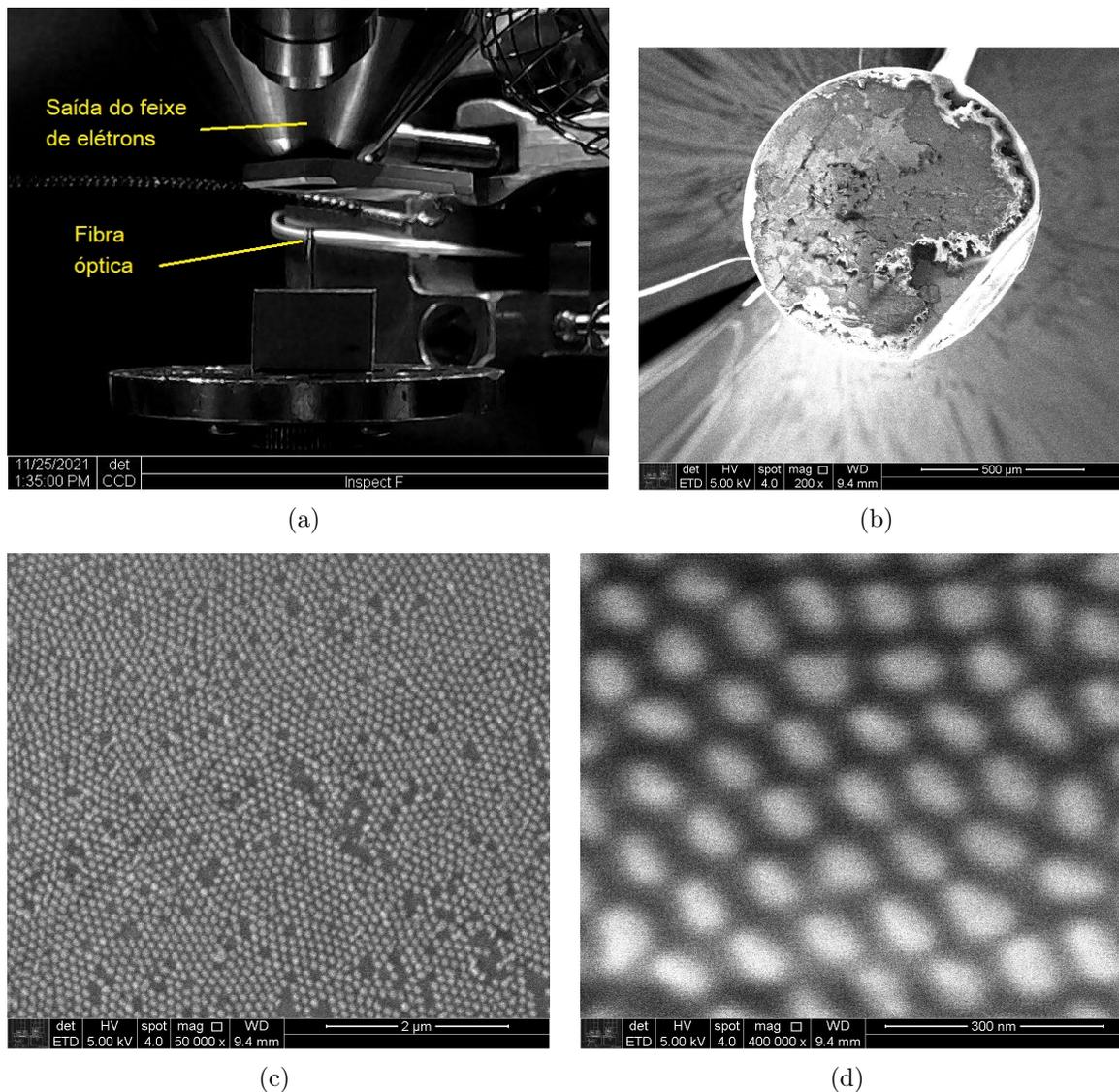


Figura 18 – Fotografia da fibra óptica no microscópio eletrônico de varredura (a), imagem de topo com aumento de $200\times$ (b) e nanocilindros fabricados na secção da fibra (c-d).

As imagens MEV em $50.000\times$ e $400.000\times$ (Figs. 18c e 18d) mostram que a preparação da fibra e o polimento da ponta foram eficientes, pois os nanocilindros também foram fabricados com êxito neste tipo de substrato. Em todos os pontos da superfície analisados encontraram-se matrizes de nanocilindros. A planicidade alcançada após sucessivas etapas de polimento permitiu que a membrana de AAP se assentasse sobre a superfície de sílica fundida sem a formação de espaços vazios entre elas. É a primeira vez que este tipo de nanoestrutura é fabricado por este método em ponta de fibra óptica.

De modo geral, as imagens de MEV com maior e menor aumento mostram que os nanocilindros se depositaram de modo organizado e periódico, e este padrão de organização está presente em toda a área superficial das amostras fabricadas com AAP (Figs. 10-18). Os nanocilindros apresentam um padrão bidimensional hexagonal de células unitárias. Estes resultados mostraram que os padrões da alumina anódica porosa foram transferidos com sucesso após a deposição de Ti e Au por *electron beam*.

A composição das superfícies com matriz de nanocilindros foi caracterizada por EDS. Selecionou-se um ponto sobre um nanocilindro (Fig. 19a) e sobre um interstício com óxido descoberto (Fig. 19b). A tensão de aceleração de elétrons foi de 5 kV. Todos os espectros EDS sobre nanocilindros e sobre SiO_2 descoberto apresentaram o mesmo padrão da Figura 19. No ponto sobre o nanocilindro, picos referentes a Au, Si, C e O estão presentes, já nas regiões escuras não há pico referente ao Au. Portanto, a superfície consiste de fato em uma monocamada de nanocilindros de Au com interstícios de SiO_2 descoberto. Si, Au e O já eram esperados devido à composição das nanoestruturas, mas e quanto ao C? A explicação proposta é que o carbono presente na superfície é um resíduo de PMMA resultante do processo de deposição da AAP.

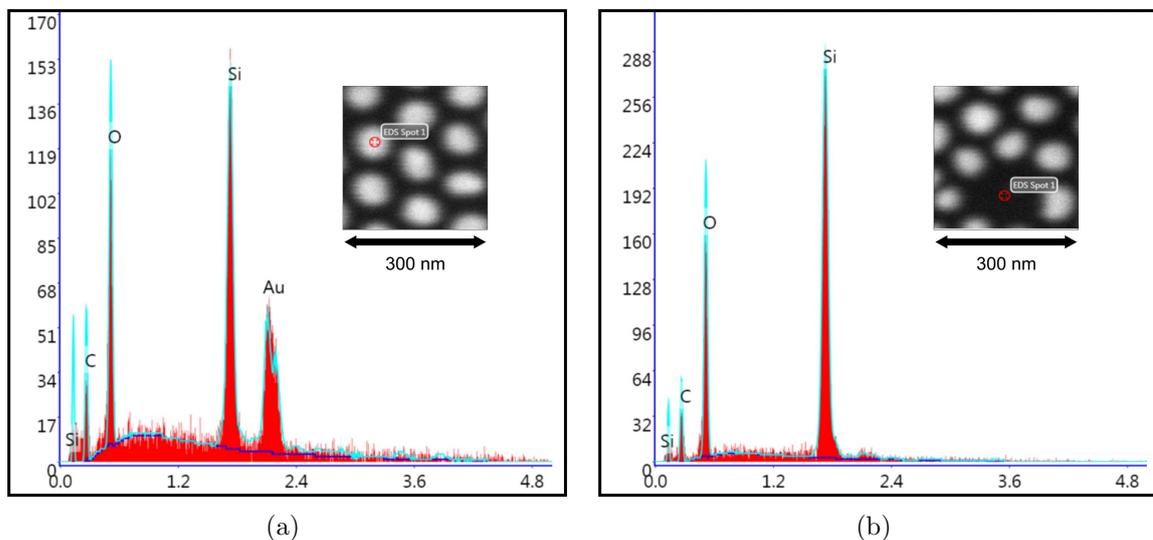


Figura 19 – Espectro de EDS obtido em um nanocilindro (a) e em um interstício (b).

Os resultados de microscopia eletrônica revelaram boa correspondência com os parâmetros nominais da membrana, como mostra a Tabela 2. A partir das imagens MEV, os valores de diâmetro efetivo dos nanocilindros das diferentes estruturas foram encontrados e aplicados como parâmetro para os cálculos de intensificação de campo próximo no domínio do tempo com diferenças finitas (FDTD - *Finite-Difference Time-Domain*). Uma breve introdução sobre o método FDTD está disponível no Anexo B. As espessuras dos nanocilindros foram medidas pelo sensor da evaporadora durante as deposições de Au e Ti reportadas nas Seções 2.1.4 e 2.1.5, seus valores estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2 – Parâmetros nominais das máscaras de alumina utilizadas na fabricação das estruturas e parâmetros experimentais obtidos das matrizes de nanocilindros.

Amostra Molécula	Dimensões (nm)							
	A NAD	B NAD	C NAD	D NAD	E GSH	F GSH	G GSH	Fibra NAD
Diâmetro nominal dos poros da máscara de alumina	30	60	80	100	60	80	100	70
Diâmetro efetivo dos nanocilindros	30 ± 3	63 ± 5	78 ± 10	98 ± 7	31 ± 8	58 ± 8	84 ± 11	63 ± 10
Periodicidade nominal na máscara de alumina	65	125	100	125	100	100	125	120
Periodicidade efetiva da matriz de nanocilindros	63 ± 4	128 ± 15	101 ± 9	130 ± 15	107 ± 14	103 ± 10	127 ± 6	114 ± 8

Tabela 3 – Medidas de espessura por sensor de quartzo durante a deposição dos metais.

Amostra	Espessura (nm)	
	Ti	Au
A	5,05	19,80
B	5,05	19,80
C	5,05	19,80
D	5,05	19,80
E	5,00	40,00
F	5,00	40,00
G	5,00	40,00
Fibra	5,05	19,80

Após a caracterização estrutural das amostras, realizou-se a caracterização óptica por meio de espectros de reflectância. Elegeu-se então o espectro correspondente ao substrato

de Si como referência no cálculo de todos os espectros de reflectância dos nanocilindros. A Figura 20a ilustra os espectros de reflectância das amostras A-D com nanocilindros com aproximadamente 25 nm de altura total, e a Figura 20b ilustra os espectros de reflectância das amostras E-G de nanocilindros com aproximadamente 45 nm de altura. Todas as medidas ocorreram em condições ambiente de temperatura e pressão.

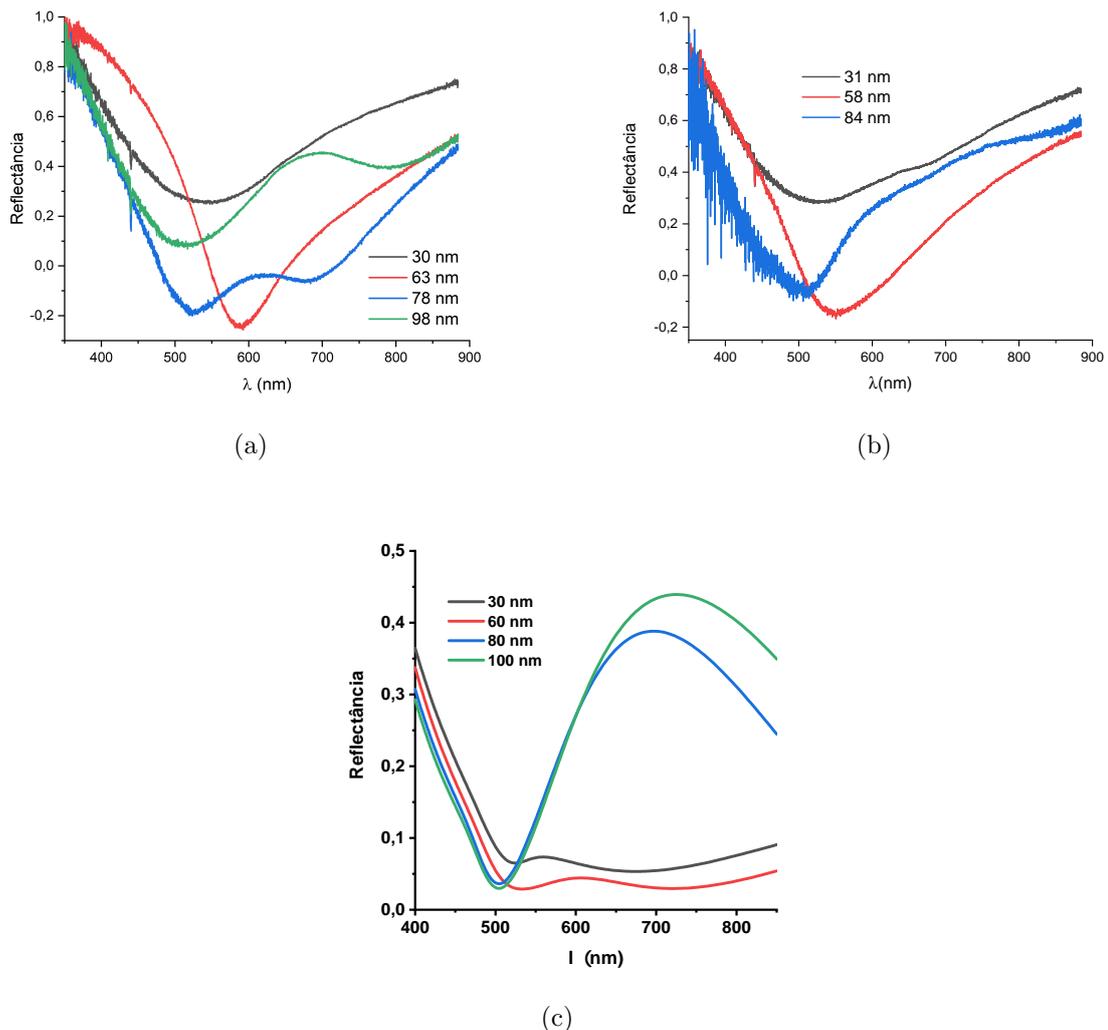


Figura 20 – Espectros experimentais de reflectância das amostras A-D (a) e E-G (b). (c) Espectros de reflectância teóricos calculados por meio dos parâmetros experimentais obtidos a partir das imagens de MEV.

A Figura 20a mostra os espectros de reflectância dos arranjos de nanocilindros de 30 nm, 63 nm, 78 nm e 98 nm respectivamente utilizados para os ensaios SERS da molécula NAD. Todas as matrizes de nanocilindros mostraram vales de reflexão, logo, as frequências de oscilações coerentes dos elétrons livres dos nanocilindros são as mesmas da luz incidente nas faixas espectrais próximas a estes comprimentos de onda. O vale mais profundo e estreito corresponde a amostra de 63 nm. Isso significa que o plasmon

localizado nos nanocilindros de 63 nm está absorvendo a luz com comprimento de onda em torno de 585 nm. Com 78 nm de diâmetro de nanocilindros o mínimo de reflectância está situado em 523 nm. Os arranjos de nanocilindros de 98 nm apresentaram o mínimo em 508 nm, já a matriz de nanocilindros de 30 nm apresentam seu mínimo de reflectância em 540 nm. Os resultados mostram que nestas amostras os modos dipolares dos plasmon não dependem apenas do tamanho dos nanocilindros, já que as posições dos mínimos de reflectância não apresentam uma dependência em relação ao tamanho dos nanocilindros. Ao se observar os valores de periodicidade das amostras (Tabela 2), nota-se que não existe um comportamento sistemático entre os períodos de repetição e o tamanho dos nanocilindros. Assim, os comportamentos dos espectros de reflectância dependem do tamanho dos nanocilindros e da periodicidade dos arranjos.

A Figura 20b ilustra os espectros de reflectância de nanocilindros com aproximadamente 45 nm de altura das amostras E-G com diâmetros efetivos dos nanocilindros de 31 nm, 58 nm e 84 nm respectivamente. O arranjo de nanocilindros de 31 nm apresenta o mínimo de reflectância em 530 nm, os correspondentes a nanocilindros de 58 nm o mínimo está situado em 551 nm, já o arranjo com nanocilindros de 84 nm tem seu mínimo de reflectância situado em 511 nm. Os resultados das amostras E-G apresentam a mesma tendência que as das amostras A, B e C (30 nm, 58 nm, 78 nm). Estes resultados também sugerem que a energia de excitação dos plasmon (mínimo de reflectância) não depende apenas do tamanho dos nanocilindros, mas também da periodicidade dos arranjos. Como as amostras são estruturas com nanocilindros de aproximadamente 30 nm, 60 nm, 80 nm e 100 nm, foram calculados os espectros de reflectância utilizando estes valores. Tais espectros foram calculados por meio do software Lumerical FDTD e os resultados são mostrados na Figura 20c. Os espectros calculados seguem a mesma tendência dos obtidos experimentalmente, já que os espectros teóricos das amostras com nanocilindros de diâmetro aproximado de 30 e 60 nm apresentam seus mínimos em 524 nm e 532 nm. Já para as amostras de 80 nm e 100 nm o mínimo está situado em 502 nm em ambos os casos.

3.2 Aplicação de dispositivos plasmônicos para intensificação Raman da NAD

3.2.1 A importância da NAD

Como mencionado no capítulo 1, a interação entre a molécula de teste e o plasmon localizado na nanopartícula é a origem das flutuações de intensidade, tempo e frequência nos espectros SERS. Devido a estas flutuações, moléculas simples com poucos modos vibracionais poderiam promover mais eventos flutuantes que moléculas com grande número de modos vibracionais. Neste sentido, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e a glutathiona (GSH) foram escolhidas como moléculas de teste no presente estudo porque (i) são moléculas complexas com alto número de modos vibracionais e (ii) são essenciais em sistemas biológicos. Além disso, a GSH e o fosfato de NAD [NAD(P)] interatuam em importante reação biológica, como será visto na Seção 3.3.1.

A NAD é essencial em todos os reinos da vida e está presente em todas as células vivas. Esta molécula foi descoberta em 1906 (118) e seu papel como um duto para oxirredução no metabolismo foi posteriormente estabelecido (119). As formas oxidada (NAD⁺) e reduzida (NADH) da molécula NAD atuam, respectivamente, como aceitador e doador de hidrogênio em muitas reações de oxirredução catalisadas por enzimas (120). Dentro das células, estas reações promovem um frágil equilíbrio entre os níveis de NAD⁺ e NADH. Portanto, flutuações neste equilíbrio de redox intracelular são consideradas um indicador de estado metabólico, pois mudam de acordo com o metabolismo (121–124).

A NAD exerce vários papéis em sistemas biológicos, como substrato, coenzima, agente redox, neurotransmissor, e neuromodulador que participa das modificações pós-traducionais de proteínas, transdução de sinal, regulação da energia do metabolismo, morte celular, envelhecimento, comunicação extracelular célula-a-célula, transcrição e expressão de genes, e reparo de DNA (125–134).

Na crista da mitocôndria, a NADH doa elétrons que são usados para sintetizar adenosina trifosfato (ATP). O ATP é empregado para a formação da ligação fosfodiéster do DNA humano (135). Dentro da mitocôndria, os níveis de NAD variam de maneira circadiana, estes níveis podem influenciar na seleção de moléculas armazenadoras de energia (136). Sob estresse, os níveis de NAD dentro da mitocôndria também determinam a sobrevivência da célula (137). Embora inúmeros estudos tenham sido publicados a respeito do papel da NAD, ainda não se pode compreender plenamente os mecanismos de geração e manutenção dos poços mitocondriais de NAD (138). Mais detalhes sobre os vários papéis

da NAD no metabolismo mitocondrial estão descritos em (139).

A NAD também tem potenciais aplicações na medicina e na indústria de medicamentos, como antibióticos, antiviral, imunossupressantes, anticâncer, tratamento de dermatite atópica rosácea e tratamento de mal de Alzheimer (135, 140, 141). Em 2013, Giangreco e Packer estudaram as interações entre NAD(P) e muitas enzimas humanas. Eles concluíram que os medicamentos já descobertos estão longe de representar toda a classe de proteínas de ligação ao NAD(P) (142). Esta conclusão se justifica porque foi aprovada apenas uma pequena parte de medicamentos que interagem com proteínas de ligação ao NAD(P) (135). Diversas doenças em seres humanos estão associadas a flutuações na taxa entre NAD^+ e NADH (143).

A estrutura da NAD consiste em dois nucleotídeos, anéis de ribose com adenina e nicotinamida, e uma ligação de difosfato mantém todas as partes interligadas (Fig.21a) (144). É importante notar que a NAD é composta por dois nucleotídeos conectados em um arranjo por meio de um grupo pirofosfato e, portanto, não pode formar longos oligonucleotídeos (145).

A conformação da NAD depende do meio em que ela se encontra. Quando esta molécula está em uma solução, seus anéis de nicotinamida e adenina ficam mais próximos um do outro a uma distância de 0,4 a 0,5 nm entre eles (Fig.21c). Em contrapartida, quando a NAD se encontra em presença de certas enzimas seus anéis de nicotinamida e adenina se afastam de 1,2 a 1,5 nm de distância entre eles e a molécula assume uma conformação mais alongada (Fig. 21b) (147–151).

Diferentes técnicas de espectroscopia podem ser aplicadas para investigar a estrutura e a dinâmica molecular da NAD (120). Uma dessas técnicas é a análise bidimensional em infravermelho (2D-IR - *2 dimensional Infrared*), pois a NAD apresenta vários modos que potencialmente podem atuar como sondas no estudo de sítios de ligações com proteínas (152). Outra técnica aplicada há quatro décadas é a espectroscopia de tempo de vida da fluorescência emitida pela NADH no estudo dos níveis redox de tecidos (153–155). Neste caso, a identificação da NADH livre ou ligada à outra molécula ocorre pela diferença do tempo de decaimento da fluorescência emitida. Mas esta não é uma tarefa fácil, pois a diferença no tempo de decaimento da fluorescência está abaixo da escala de nanossegundos (156). Este desafio tem sido superado com a espectrometria de mobilidade de íons aprisionados (TIMS - *Trapped Ion Mobility Spectrometry*) combinada com medidas de tempo de decaimento da fluorescência (157–159). Molano-Arevalo *et al.* foram além e acoplaram a TIMS à espectrometria de massa (TIMS-MS), e utilizaram também espec-

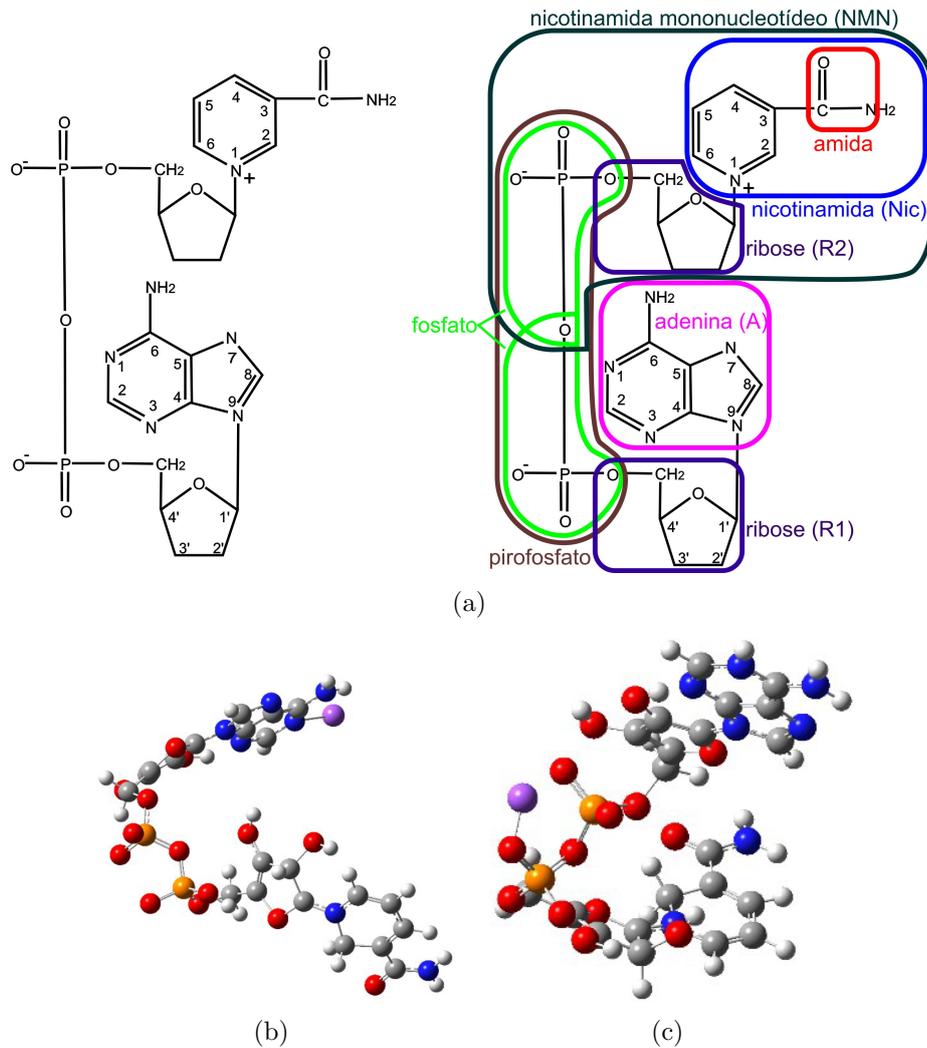


Figura 21 – Molécula de NAD e indicação de suas partes (a) (146). (b e c) Estruturas propostas da NAD⁺ nas conformações “aberta” e “fechada”, respectivamente. As esferas brancas, cinza, vermelhas, laranjas e azuis correspondem aos átomos de hidrogênio, carbono, oxigênio, fósforo e nitrogênio, respectivamente (120).

Fonte: (120, 146)

troscopia de dissociação de múltiplos fótons no infravermelho (IRMPD- *Infrared Multiple Photon Dissociation*) e simulações de dinâmica molecular. Os resultados obtidos mostraram que ligações de hidrogênio atuam como força motriz na estabilidade estrutural e na dinâmica conformacional de NAD^+ e NADH (120). Estes são apenas alguns exemplos de técnicas de espectroscopia e combinações que vêm trazendo melhor compreensão sobre as estruturas envolvidas na atividade biológica da NAD.

Como já mencionado em dispositivos baseados em LSPR, a presença de moléculas pode alterar a formação do plasmon, e isso é utilizado como princípio de transdução. Todavia, Warren e Thimsen fabricaram um dispositivo baseado em LSPR que utilizou a formação do plasmon não apenas como princípio de transdução, mas também para catalisar reações de oxidorredução (160). Neste caso, a energia do plasmon gerou elétrons “quentes” na nanopartícula por decaimento eletromagnético de plasmon de superfície (161). Quando havia NAD e hidrogênio disponíveis na superfície da nanopartícula, elétrons quentes fotogerados puderam ser transmitidos da nanopartícula para a molécula NAD gerando assim NADH (162). Iglesias, Chuvilin e Grzelczak demonstraram que nanopilares de ouro com um pouco de platina nas extremidades regeneraram NAD sob luz visível e infravermelha (162). Existem também estudos de LSPR que funcionalizam uma superfície de nanopartícula de Au com polímero para a detecção de NADH (163).

A técnica SERS é aplicada na detecção de NAD há mais de trinta anos desde quando Siiman, Rivellini e Patel utilizaram prata coloidal para investigar a conformação de NAD e NADH em soluções de diferentes concentrações (102). Concluiu-se que as partículas de prata se comportavam como uma enzima artificial, pois a NAD assumia sua conformação estendida e se adsorvia à superfície de prata. Esta adsorção é ancorada por uma ligação química entre a superfície e o grupo adenina. O grupo nicotinamida se manteria próximo à superfície, mas não quimicamente adsorvido às partículas de prata (102). Posteriormente, outros trabalhos surgiram na mesma direção contendo outros métodos de análise da molécula NAD por SERS-LSPR (146, 164, 165). Estes experimentos e outros similares que analisaram adenina e nicotinamida separadamente, bem como a nicotinamida mononucleotídeo (NMN) atribuíram os modos vibracionais da NAD às suas linhas Raman. A LSPR é a origem do efeito SERS que intensifica as linhas Raman da NAD, esta técnica vem se mostrando a mais promissora tanto para o estudo estrutural desta molécula quanto para a fabricação de um dispositivo plasmônico destinado à sua detecção.

3.2.2 Deposição da NAD e sua análise SERS

A molécula NAD foi fornecida em forma de pó por Fluka® e não passou por qualquer processo de preparação antes de entrar em contato com o solvente. A NAD foi depositada nas amostras de lâmina de silício e fibra óptica pelo seguinte procedimento:

1. Quarenta e oito horas antes da análise Raman, as amostras foram mergulhadas em acetona em ebulição por 90 minutos, em seguida foram imersas em isopropanol em ebulição por mais 10 min, e por fim, secas em jato de N₂. O objetivo deste processo foi desengordurar a superfície a ser analisada para remover impurezas eventualmente adsorvidas durante o período de armazenamento e manuseio da amostra.
2. A solução com a molécula de teste foi preparada cerca de quarenta e oito horas antes da análise SERS. O soluto foi diluído em concentração de 10⁻³ mol/L em solução aquosa contendo 0,1 mol/L de KCl.
3. As amostras foram imersas na solução contendo a molécula de teste e assim permaneceram em repouso durante vinte e quatro horas.
4. No momento de realizar a análise por SERS, as amostras foram retiradas da solução e lavadas com água corrente filtrada e deionizada. Com esta lavagem, assegurou-se que apenas uma monocamada ou menos de moléculas permaneceu adsorvida na superfície da amostra.
5. Por fim, as amostras foram secas com jato de N₂.

Como já é bem conhecido, a molécula NAD tem muitos modos Raman ativos (106–108, 166, 167). Então antes de tudo, foi necessário obter o espectro Raman da molécula NAD na forma fornecida para servir como referência e se verificar também a repetibilidade de suas medidas. Colocou-se a NAD em forma de pó diretamente na lâmina de microscópio e colheram-se quatro espectros Raman com laser $\lambda=785$ nm e 700 μ W de potência. Os espectros foram obtidos sequencialmente nas mesmas condições no intervalo de tempo T (Fig. 22).

A resposta em espalhamento Raman se mostrou estável no tempo e o padrão do espectro não foi alterado (Fig. 22). A linha mais intensa está em 1030 cm⁻¹ e é atribuída à vibração em modo *stretching* do anel de nicotinamida (164, 165, 168). Em uma intensidade menor, observa-se a linha em 730 cm⁻¹ atribuída à vibração em modo *stretching* do anel da adenina (164, 165, 168), 1113 cm⁻¹ está atribuído à vibração da ribose que está próxima

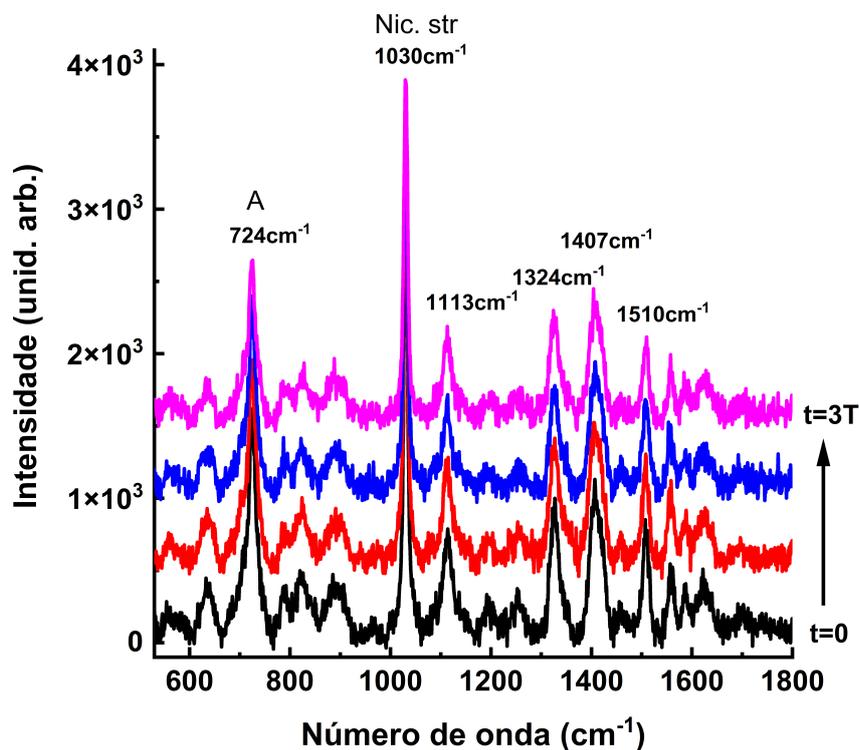
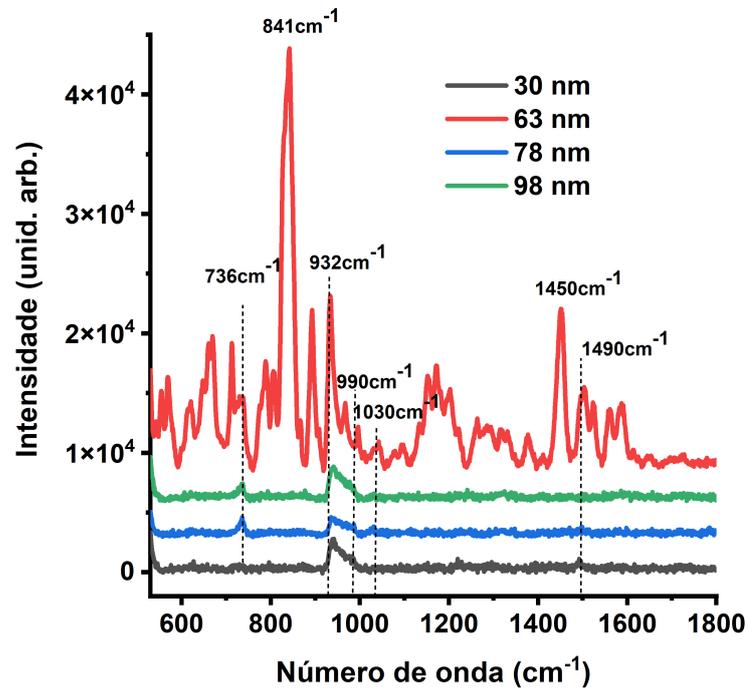


Figura 22 – Espectros Raman de moléculas NAD em forma de pó.

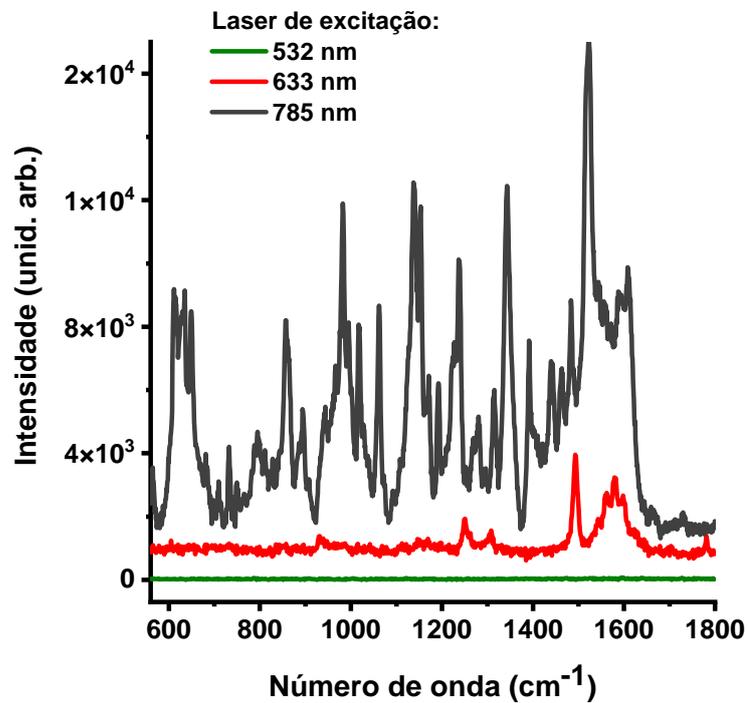
à nicotinamida (164, 165, 168), 1324 cm^{-1} corresponde à vibração do anel de adenina ou à vibração de NH_2 em modo *rock* (164, 165), 1407 cm^{-1} corresponde às vibrações da adenina e da nicotinamida (164, 168), 1510 cm^{-1} corresponde também a outro modo vibracional do anel de adenina com fraca influência da ribose próxima (164). Na NAD em forma de pó, a linha mais intensa em 1030 cm^{-1} atribuída à nicotinamida indica que a secção transversal Raman associada à vibração do anel de nicotinamida tem o valor mais alto em moléculas NAD.

O primeiro passo da investigação do SERS foi a comparação de espectros obtidos em amostras com diferentes diâmetros de nanocilindros e periodicidade. O objetivo desta etapa foi identificar quais as geometrias de nanoestruturas promoveriam ressonância plasmônica e qual o resultado quando regiões ressonantes interatuam com a NAD. Elegeram-se as amostras A (30 nm), B (63 nm), C (78 nm) e D (98 nm) para a análise com a NAD (Tabela 2). Então espectros SERS correspondentes às matrizes de nanocilindros de 30, 63, 78 e 98 nm de diâmetro foram obtidos com excitação laser de 785 nm em potência constante de 3,5 mW (Fig.23).

No espectro SERS mostrado na Figura 23a pode-se ver que a intensificação Raman está relacionada às características estruturais da matriz. As matrizes com nanocilindros



(a)



(b)

Figura 23 – (a) Espectros SERS de NAD em nanocilindros de 30 nm, 63 nm, 78 nm e 98 nm com laser de excitação de 785 nm. (b) Os espectros SERS de NAD em laser de 532 nm, 633 nm e 785 nm em matriz de nanocilindros de 63 nm.

de diâmetros iguais a 30, 78 e 98 nm mostraram baixíssima intensidade relativa Raman de alguns modos vibracionais da NAD. A larga banda Raman ($932\text{ cm}^{-1} - 990\text{ cm}^{-1}$) nestas amostras corresponde ao fônon de segunda ordem (2TO - *Transverse Optical*) do Si (169), pois as nanoestruturas de Au foram fabricadas sobre substrato de Si. As amostras de 78 e 98 nm mostraram baixo espalhamento Raman em 736 cm^{-1} atribuído à vibração em modo *stretching* do anel de adenina (164, 165, 168), isto sugere que moléculas NAD são adsorvidas preferencialmente pela adenina nestas amostras. As amostras de 30 nm mostraram baixa intensidade de espalhamento em 1490 cm^{-1} que também é atribuído à vibração do anel de adenina (152, 168), como mencionado. É importante destacar que o filme fino de Au e Ti com a mesma espessura e composição dos nanocilindros foi utilizado como referência, como mencionado na Seção 2.1.3, e nesta referência não foram observados picos no espectro com molécula NAD. Portanto, a intensidade de espalhamento Raman nas amostras de 30, 78 e 98 nm foi efetivamente relacionado a fenômenos SERS.

Na Figura 23a, o espectro SERS da NAD na amostra de 63 nm mostrou notável intensidade de linhas Raman, na qual a mais intensa está em 841 cm^{-1} atribuída ao modo vibracional do fosfato próximo à adenina da molécula NAD. Esta linha não foi observada no espectro da amostra NAD em forma de pó nem nos nanocilindros de 30, 78 e 98 nm. A intensificação SERS em 841 cm^{-1} na matriz de 63 nm estimada é de aproximadamente quatro ordens de magnitude, este nível de intensificação foi reportado na SERS de uma única molécula (8). Como a matriz de 63 nm mostrou alta intensidade SERS, estudou-se a SERS em função do comprimento de onda do laser de excitação para esta amostra (Fig. 23b). O resultado mostrou que a eficiência SERS foi maior com laser de excitação de 785 nm. Embora a intensificação em excitação de 633 nm seja significativa, ela é pequena comparada com a obtida em 785 nm. Não foram observados picos Raman quando o laser de excitação foi de 532 nm. Notou-se que as linhas Raman em nanocilindros de 63 nm flutuam ao longo do tempo. A origem destas flutuações será discutida nas Seções 3.2.3 e 3.3.3. A origem do comportamento SERS em relação à característica da matriz e a energia da fonte laser será discutida na Seção 3.2.3. A discussão contará com o suporte de cálculos teóricos de comportamento de campo elétrico próximo nestas amostras.

As intensidades de campo próximo das matrizes de nanocilindros foram obtidas por meio de cálculos teóricos com software Lumerical FDTD a partir dos parâmetros geométricos das matrizes extraídos das imagens de microscópio eletrônico. O comportamento do campo próximo nos dá características do plasmon formado nas amostras. A Figura 24a retrata a intensidade do campo elétrico próximo calculado para diferentes matrizes. Nesta figura, primeiro foi analisado o comportamento do campo próximo em comprimento de

onda na região de 785 nm. Como se pode ver, nesta região a matriz de 63 nm apresentou a maior intensificação em comparação às outras. Esta mesma tendência foi observada nos resultados experimentais de SERS em matrizes de 63 nm. Analisando agora somente o espectro do campo próximo da amostra correspondente à matriz de 63 nm (curva vermelha na Fig. 24a), note que a maior intensificação corresponde a excitação de 785 nm seguida por 633 nm e 532 nm. Novamente, estas tendências foram observadas em espectros Raman de NAD nas matrizes de 63 nm (Fig. 23b).

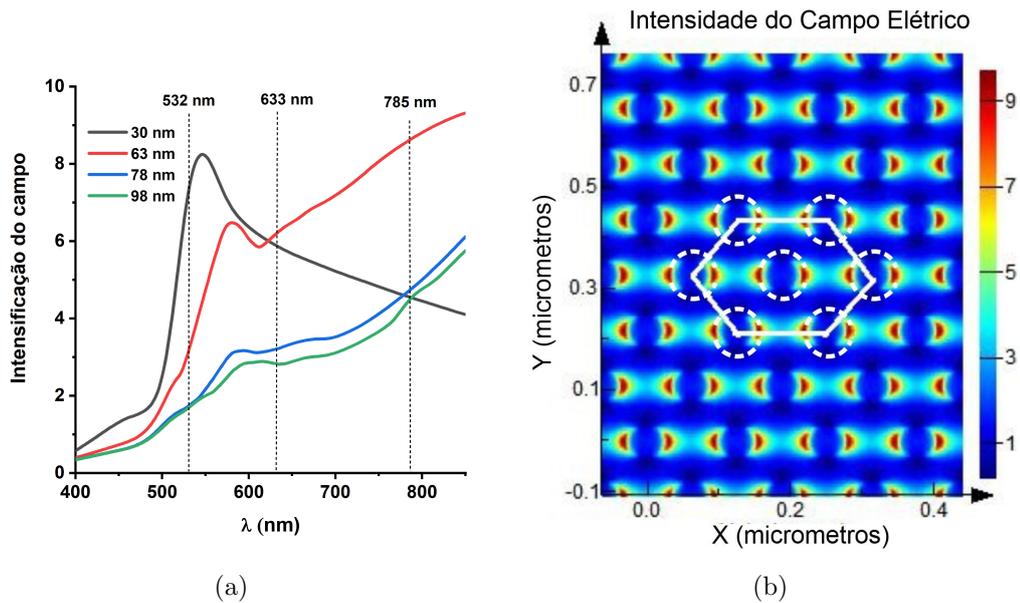


Figura 24 – (a) Intensidade de campo elétrico próximo das matrizes de 30, 63, 78 e 98 nm. As linhas tracejadas verticais indicam a posição das fontes laser utilizadas para excitar as amostras. (b) A imagem de intensidade de campo próximo correspondente à matriz de 63 nm. O \vec{E} do laser de 785 nm está polarizado na direção x

A característica do campo próximo da matriz de 63 nm em 785 nm revelou a característica dipolar do plasmon localizado que é responsável pela intensificação do campo próximo e, conseqüentemente, pela intensificação SERS nos resultados experimentais. Apesar dos cálculos FDTD explicarem as tendências dos resultados experimentais em relação às nanoestruturas e ao laser de excitação, a baixa intensificação teórica do campo não pode explicar com sucesso as gigantescas intensidades SERS observadas na amostra de nanocilindros de 63 nm. Seguindo o mecanismo convencional da origem eletromagnética do SERS, a intensificação Raman poderia ser E^4/E_0^4 (170), que nos cálculos do presente trabalho alcançaram o valor máximo de intensificação de 64 vezes, onde E é a intensidade de campo elétrico local próximo ao *hot spot* e E_0 é a intensidade do campo elétrico incidente. Por outro lado, as linhas Raman de moléculas NAD na amostra de 63 nm flutuaram ao longo do tempo sob as mesmas condições experimentais, e este comportamento também não pode ser explicado pelo mecanismo eletromagnético convencional do

plasmon localizado. Na Seção 3.2.3, será discutido o elevado efeito SERS e as flutuações das linhas Raman de NAD sobre as matrizes de nanocilindros de 63 nm, sugerindo um possível mecanismo destes efeitos.

3.2.3 As flutuações SERS com a molécula NAD

Como visto, o SERS da NAD adsorvida em matrizes de 63 nm mostrou efeito de intensificação SERS de $6,5 \times 10^4$ vezes para alguns modos vibracionais de NAD. Isto ocorreu quando a amostra foi excitada com fonte laser de 785 nm. As linhas Raman desta amostra são muito intensas e flutuam ao longo do tempo. Além disso, o padrão destas flutuações depende da potência do laser de excitação. As flutuações Raman foram observadas quando o set up experimental estava condicionado à detecção de uma única molécula. Como a absorção de NAD na amostra do presente trabalho consiste em praticamente uma monocamada, pode-se considerar as flutuações SERS como um evento que ocorre em uma única molécula, como será explicado.

Para estudar o comportamento dinâmico destas flutuações, espectros Raman foram obtidos em modo de varreduras consecutivas, em que cada varredura teve duração de 20 segundos ($T = 20$ s). Ou seja, a cada 20 segundos uma nova varredura Raman foi registrada sob as mesmas condições experimentais. As Figuras 25-31 mostram os espectros Raman de NAD sobre nanocilindros de 63 nm excitados por laser de 785 nm com potência de 7 mW, 3,5 mW, 700 μ W, 350 μ W, 35 μ W e 70 nW, respectivamente. Em todos estes espectros as linhas de base (*background*) já foram subtraídas. Em adição, são mostrados também os mapas bidimensionais destes espectros considerando três níveis de escala definidos pelo nível máximo do pico Raman ($Imáx$), $Imáx/2$ e $Imáx/4$. Em todas as imagens de mapas foi considerado o menor valor da escala fixado pouco acima do valor do nível de ruído do sinal Raman. Portanto, sinais de ruído foram evitados e as imagens de mapas 2D representam apenas sinais Raman. As atribuições das linhas SERS da NAD observadas nas Figuras 25-31 foram extraídas da Tabela 4 do ApêndiceA.

Quando a potência de excitação foi 7 mW (Fig. 25), os espectros Raman mostraram a linha mais intensa em 618 cm^{-1} . Esta linha é atribuída à vibração da adenina e possui intensidade de 1,3 vezes maior que o fônon de segunda ordem (2TO) do Si. Nesta potência, o fônon de segunda ordem (2TO) do Si se mostrou intenso e constante ao longo do tempo. A linha Raman em 1432 cm^{-1} , atribuída à vibração da ribose, também se mostrou intensa em comparação com outras. No entanto, estas linhas também flutuaram ao longo do tempo. As flutuações de outras linhas Raman são mais frequentes ao longo do tempo,

com um pequeno deslocamento na frequência de oscilação dos modos.

A Figura 26 mostra os espectros Raman e suas representações em mapas 2D quando a potência de excitação laser foi de 3,5 mW. Neste caso, a linha Raman mais intensa foi localizada em 619 cm^{-1} (adenina) e esta intensidade foi 5,5 vezes maior do que o fônon de segunda ordem (2TO) do Si. A baixa intensidade Raman do Si era esperada pois utilizou-se laser de baixa potência. Entretanto, o valor da linha Raman mais intensa de NAD aumentou em relação à linha Raman do Si que foi assumido como uma referência interna. Embora a linha Raman em 619 cm^{-1} seja a mais intensa, esta linha flutua ao longo do tempo, aparecendo e desaparecendo (Fig. 26b). Outras linhas Raman de baixa intensidade (Fig. 26c e 26d) também flutuam ao longo do tempo de maneira mais randômica em comparação com às obtidas em laser com potência de 7 mW. Além disso, é possível observar que as flutuações promovem o aparecimento de novos modos vibracionais, pois acontecem também nas frequências de vibração de NAD. Em laser com potência de $700\text{ }\mu\text{W}$ (Fig. 27a), a maior linha Raman aparece na primeira varredura e desaparece nas seguintes (Fig. 28a). Esta linha Raman, localizada em 1464 cm^{-1} atribuída ao anel de adenina (164, 165), apresentou intensidade de cerca de 19 vezes a do fônon de segunda ordem (2TO) do Si. Como esperado, a banda Raman do Si diminuiu devido à baixa potência do laser, contudo, o efeito SERS continuou muito intenso. Outras linhas Raman de baixa intensidade mostraram flutuações randômicas ao longo do tempo em outras frequências de vibração (Fig. 28b-28c).

Em laser com potência de $350\text{ }\mu\text{W}$ (Fig. 29), a banda Raman de segunda ordem do Si praticamente desaparece. Além disso, há três linhas Raman de NAD com maior intensidade (3×10^4 unidades arbitrárias) que aparecem em diferentes momentos do registro do espectro. Estas linhas Raman estão posicionadas em 728 cm^{-1} , 949 cm^{-1} e 1197 cm^{-1} e estão atribuídas ao modo vibracional do anel de adenina (106–108, 166, 167). Assim como antes, as linhas Raman de baixa intensidade flutuaram randomicamente ao longo do tempo em outras frequências de modos vibracionais. Em laser com potência de $35\text{ }\mu\text{W}$, há quatro linhas Raman com intensidades equivalentes, onde a mais alta é da ordem de $1,3 \times 10^4$ unidades arbitrárias. Estas linhas Raman apareceram em diferentes momentos em uma ou outra aquisição de espectros e desapareceram ao longo do tempo (Fig. 30). Novamente, as linhas Raman de baixa intensidade flutuaram de modo randômico ao longo do tempo em diferentes frequências vibracionais (Fig. 30b-30d). Surpreendentemente, foram observadas flutuações das linhas Raman em potência de laser de 70 nW (Fig. 31). Nesta potência, a maior linha Raman apareceu em 925 cm^{-1} na varredura em $t = 9T$, que está atribuída à vibração do fosfato ou da nicotinamida (106–108, 166, 167), e outra

linha Raman intensa está localizada em 704 cm^{-1} e corresponde à vibração do anel de adenina (106–108, 166, 167). Outra linha Raman intensa está posicionada em 708 cm^{-1} e corresponde à vibração do anel de adenina (106–108, 166, 167). Nesta potência, as flutuações ao longo do tempo e as frequências dos modos vibracionais são randômicas.

Note que todas as linhas Raman de NAD flutuaram de tal maneira que não houve qualquer modo vibracional Raman persistente. Logo, cada linha Raman registrada em uma varredura não apareceu novamente nas outras varreduras registradas. Estes comportamentos são mais evidentes para espectros Raman excitados com potência laser igual ou menor que $3,5\text{ mW}$. Isto indica um comportamento de maior flutuação randômica para baixa potência do laser de excitação. A inexistência de linhas Raman persistentes em nosso experimento está em desacordo com os resultados relatados em (105, 171), onde foram identificadas algumas linhas Raman persistentes e outras com comportamento piscante.

Para fins comparativos, os espectros SERS de NAD foram obtidos também em aglomerados de nanoesferas de Au de 80 nm e 40 nm de diâmetro. Espectros Raman destas superfícies SERS estão na Figura 32. Em ambos os casos, a linha mais intensa é a de 730 cm^{-1} correspondente à vibração do anel de adenina. Ao se comparar a intensidade deste modo vibracional com o da Figura 22, conclui-se que houve intensificação Raman e as amostras de aglomerados de nanoesferas de ouro são superfícies SERS. Os espectros SERS de aglomerados de esferas de 80 nm não flutuaram e suas linhas Raman se mostraram persistentes ao longo do tempo. Os espectros SERS de aglomerados de esferas de 40 nm apresentaram ligeira flutuação em algumas de suas linhas Raman.

Para quantificar as randômicas flutuações SERS, o conceito de matriz de co-ocorrência de níveis de cinza (GLCM - *Gray-Level Co-occurrence Matrix*) foi introduzido aqui. A matriz de co-ocorrência é largamente utilizada em análises de texturas de imagens (172). Esta teoria inclui diferentes parâmetros que caracterizam a textura de tons de cinza por meio de parâmetros como contraste, dissimilaridade, homogeneidade, energia, entropia, média, variância e correlação (172–174). No presente trabalho, o interesse está nas flutuações das linhas Raman ao longo do tempo e frequências dos modos vibracionais. Logo, determinou-se o parâmetro de correlação ao longo do tempo e as frequências dos modos vibracionais, respectivamente. Então, a correlação da intensidade dos espectros Raman foi calculada em função do número de onda e do tempo, como as imagens de matriz de nível de cinza a partir das quais a matriz GLCM é definida. O parâmetro GLCM de correlação foi obtido por meio das equações (3.1, 3.2, 3.3) (172–174):

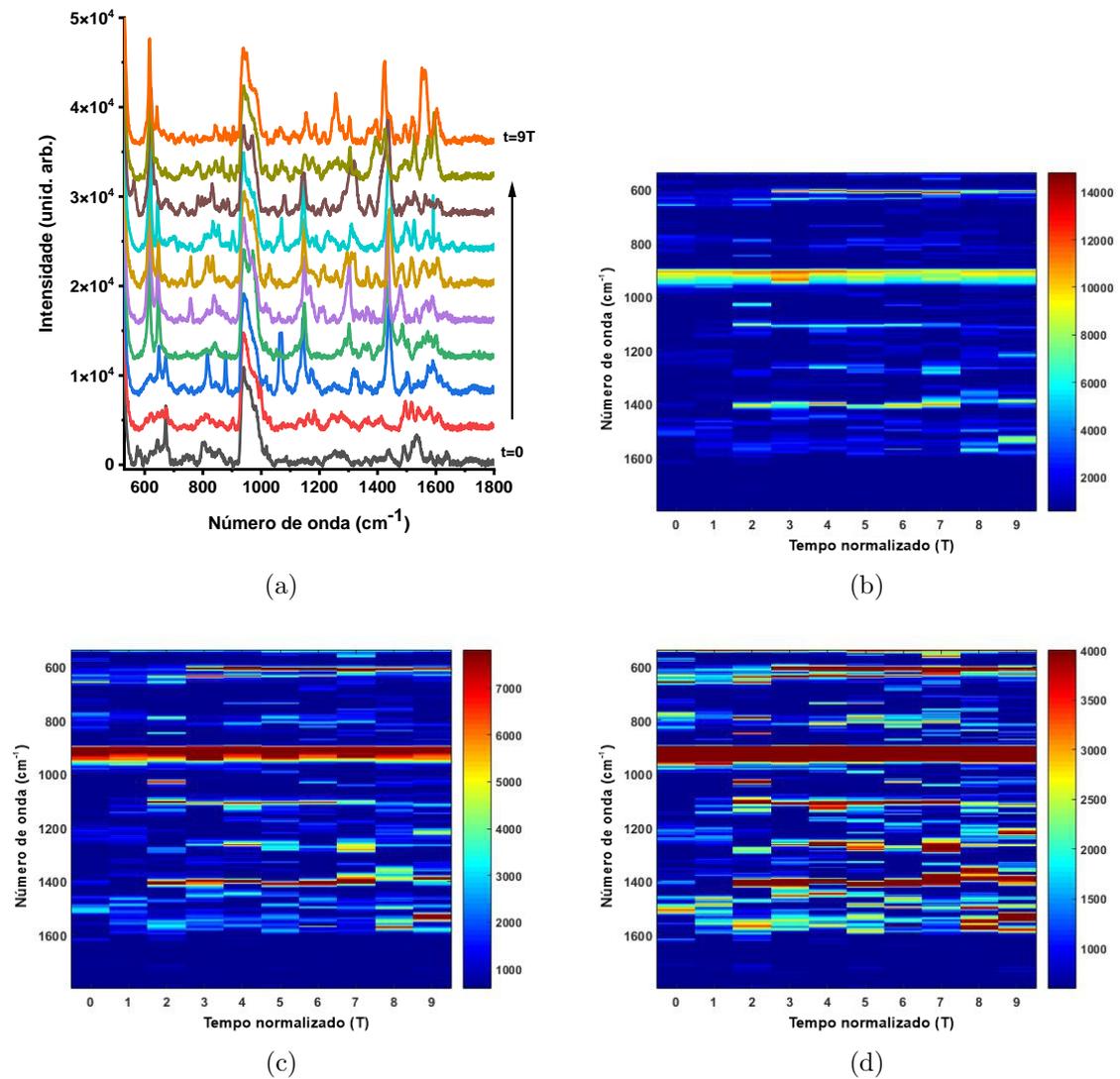


Figura 25 – Espectros SERS de NAD sobre a matriz de nanocilindros de 63 nm excitada por uma fonte laser de 785 nm e 7 mW de potência (a). Mapas 2D de espectros SERS usando a escala do pico mais intenso (b), a metade da escala do pico mais intenso (c) e um quarto da escala do pico mais intenso (d).

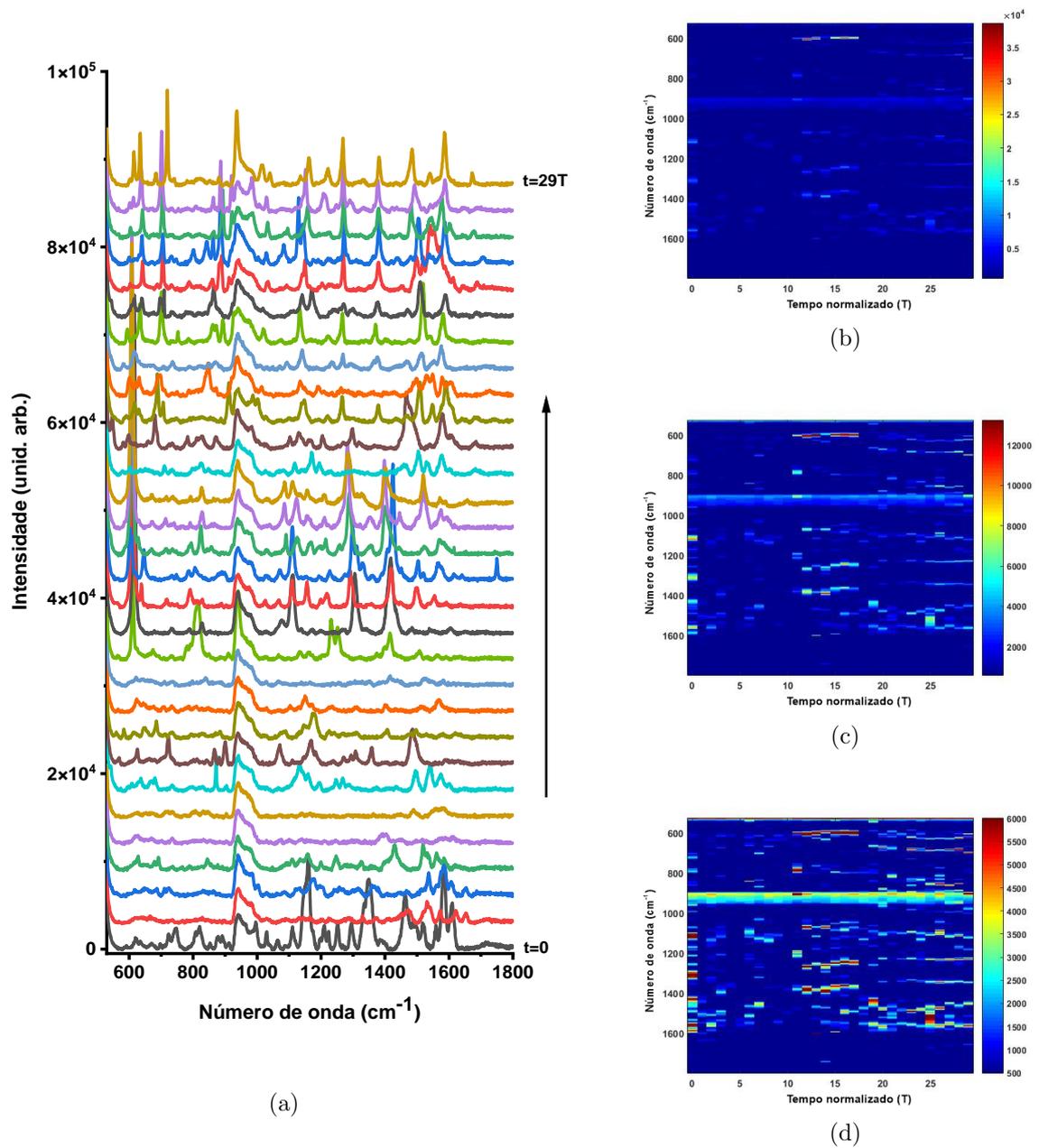


Figura 26 – Espectros SERS de NAD sobre a matriz de nanocilindros de 63 nm excitada por uma fonte laser de 785 nm e 3,5 mW de potência (a). Mapas 2D de espectros SERS usando a escala do pico mais intenso (b), a metade da escala do pico mais intenso (c) e um quarto da escala do pico mais intenso (d).

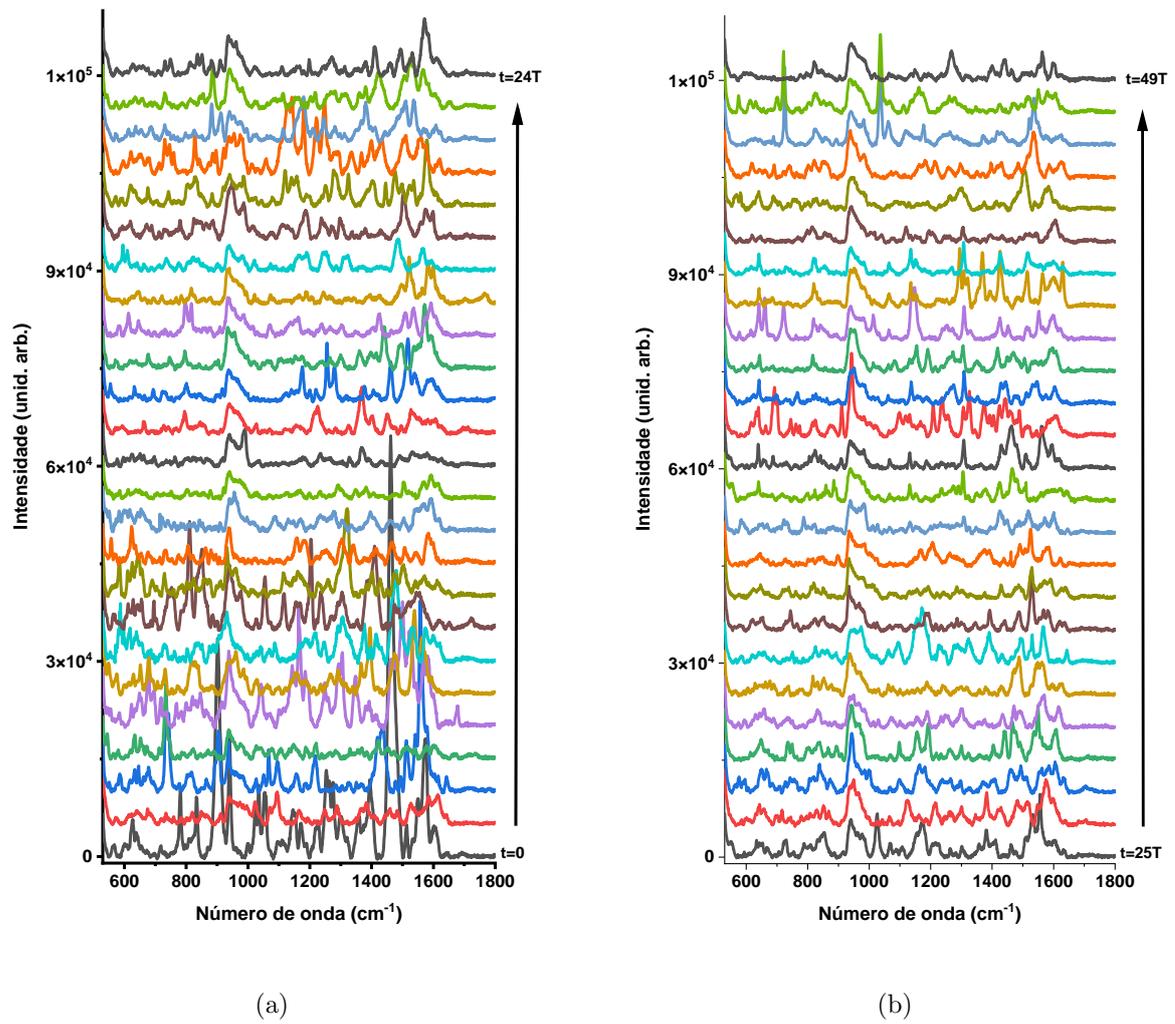


Figura 27 – Espectros SERS de NAD sobre a matriz de nanocilindros de 63 nm excitada por uma fonte laser de 785 nm e 700 μW de potência.

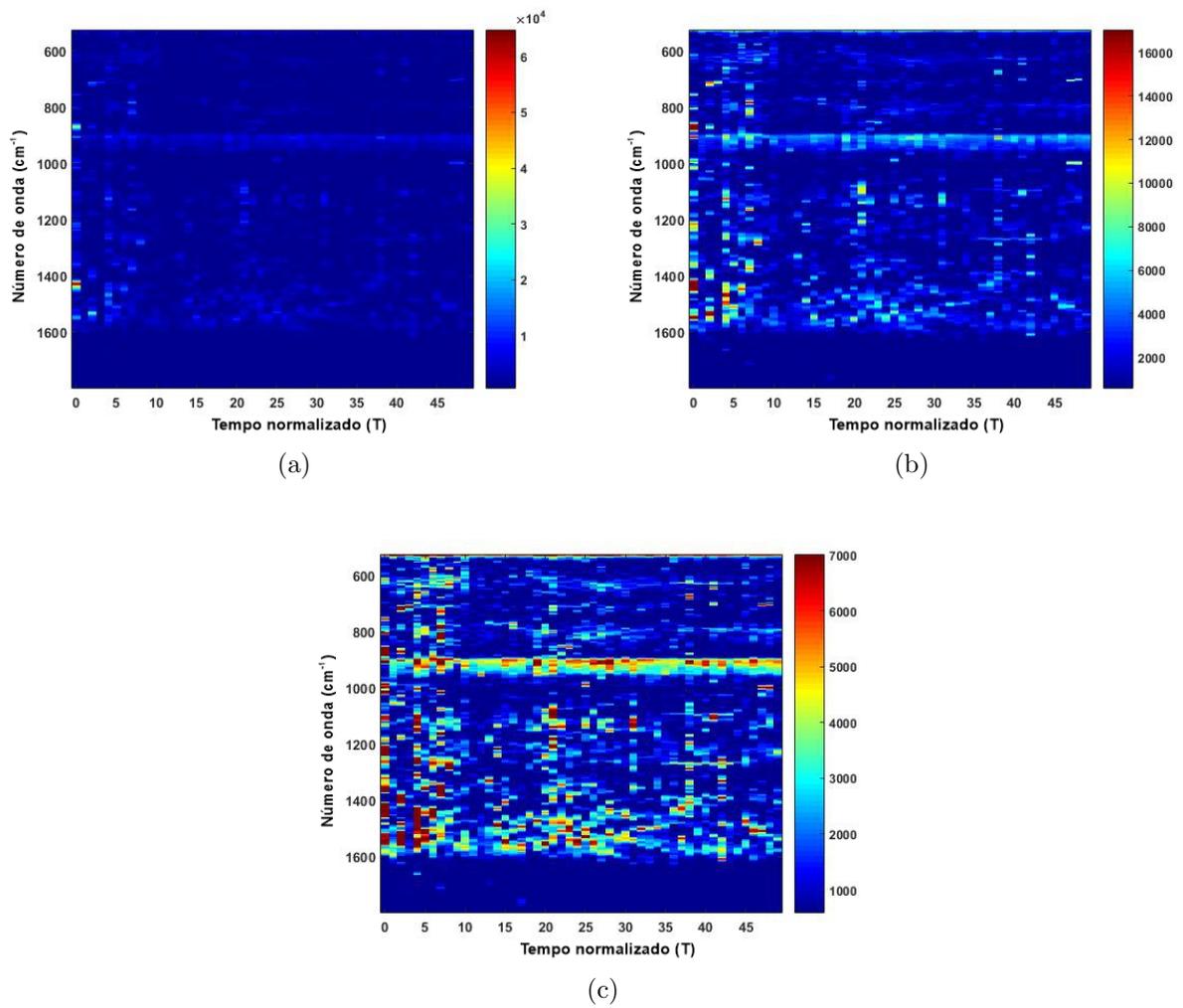


Figura 28 – Mapas 2D dos espectros SERS referentes à Figura 27 usando a escala do pico mais intenso (a), a metade da escala do pico mais intenso (b) e um quarto da escala do pico mais intenso (c).

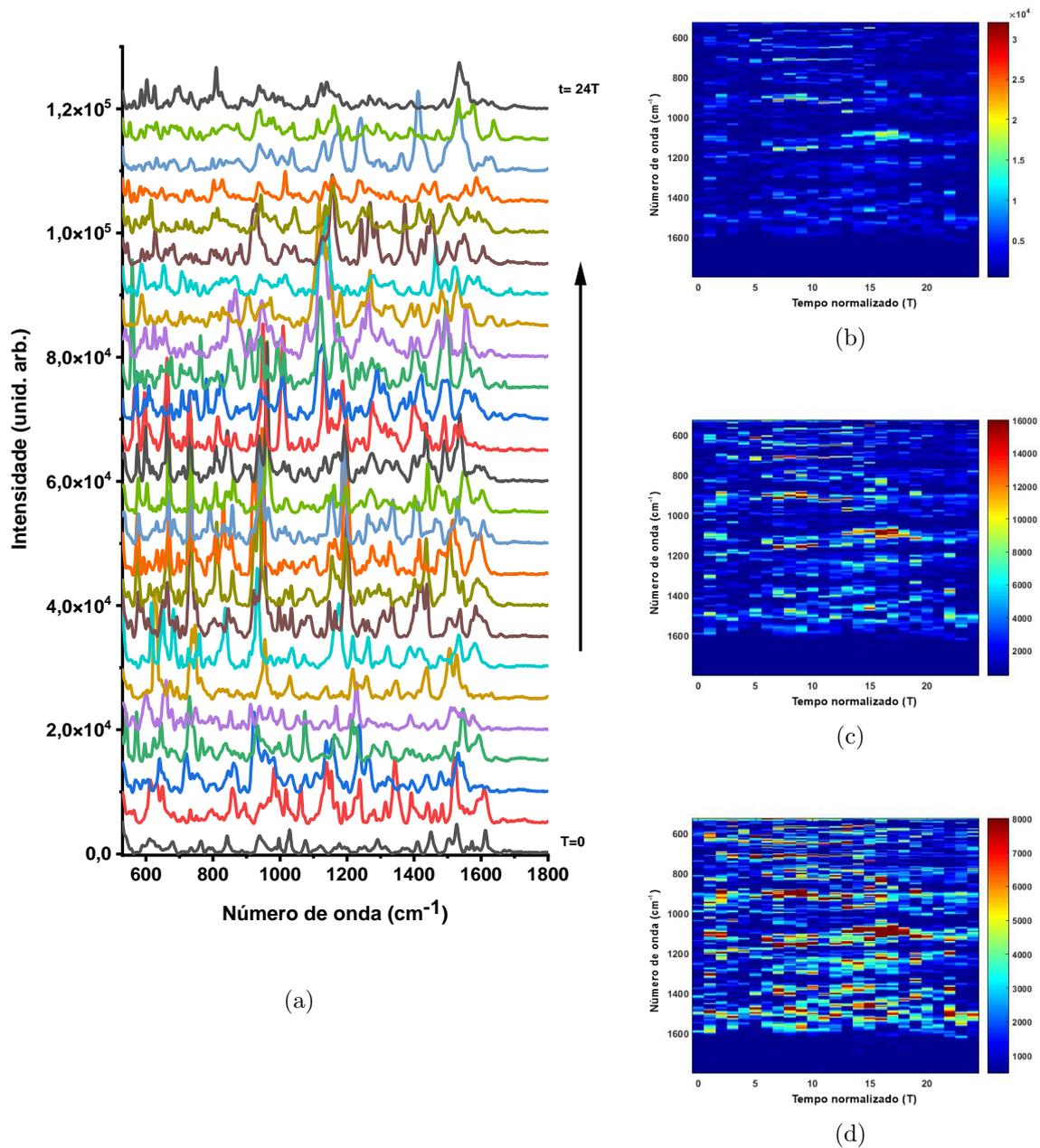


Figura 29 – Espectros SERS de NAD sobre a matriz de nanocilindros de 63 nm excitada por uma fonte laser de 785 nm e $350 \mu\text{W}$ de potência (a). Mapas 2D de espectros SERS usando a escala do pico mais intenso (b), a metade da escala do pico mais intenso (c) e um quarto da escala do pico mais intenso (d).

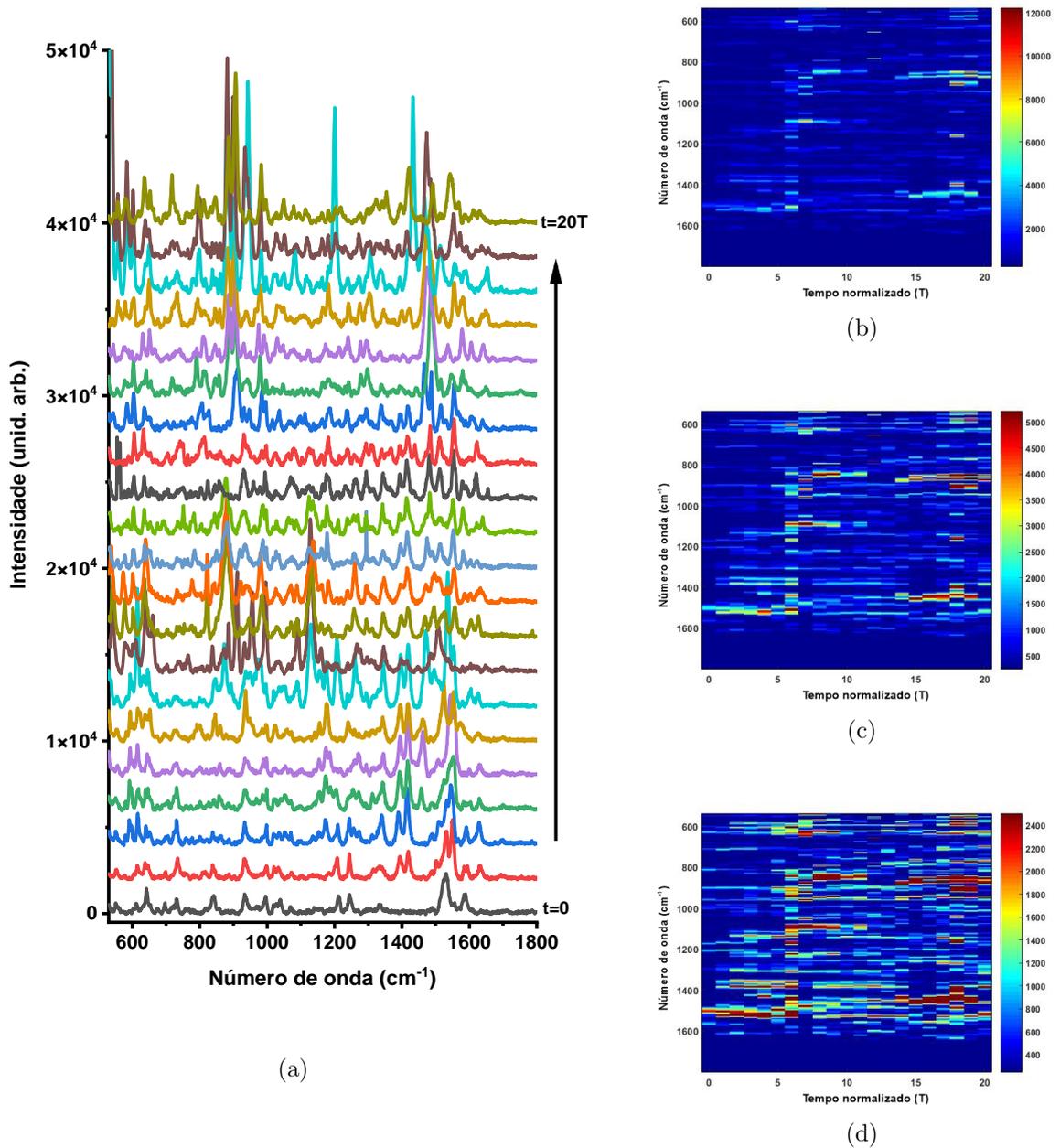


Figura 30 – Espectros SERS de NAD sobre a matriz de nanocilindros de 63 nm excitada por uma fonte laser de 785 nm e $35 \mu\text{W}$ de potência (a). Mapas 2D de espectros SERS usando a escala do pico mais intenso (b), a metade da escala do pico mais intenso (c) e um quarto da escala do pico mais intenso (d).

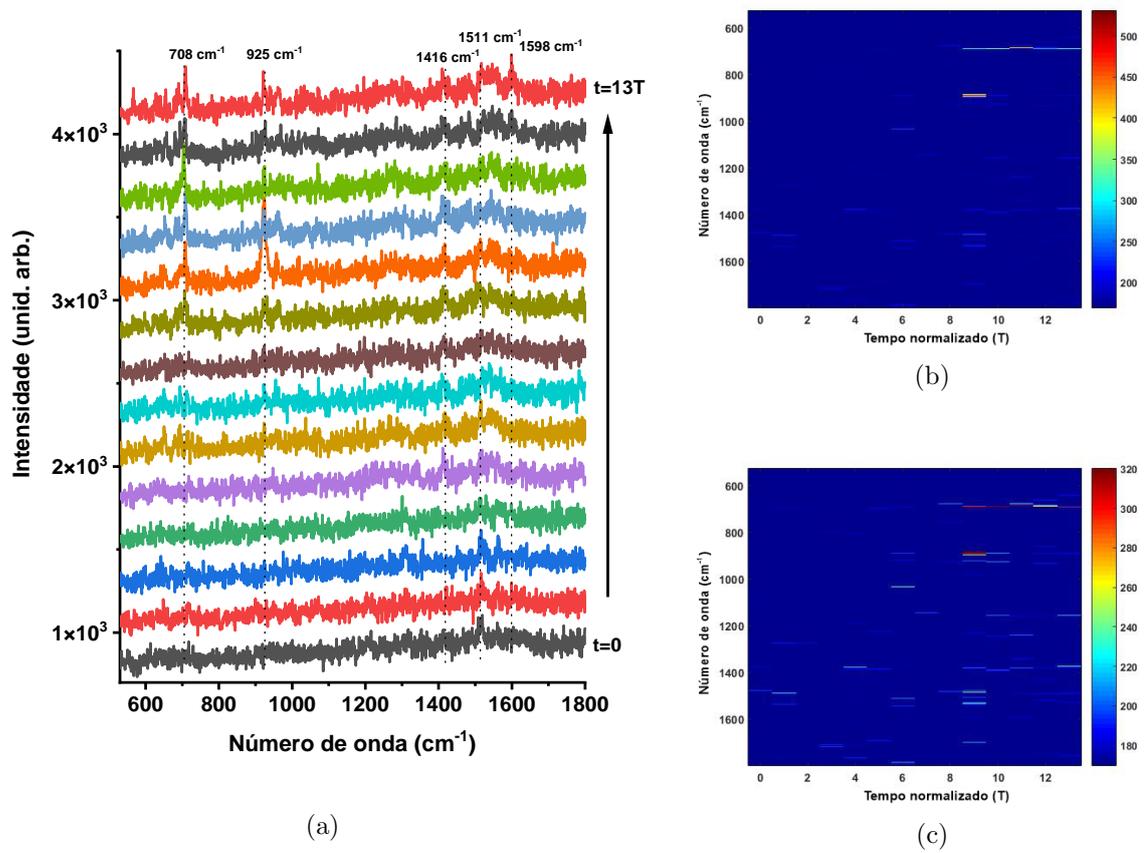
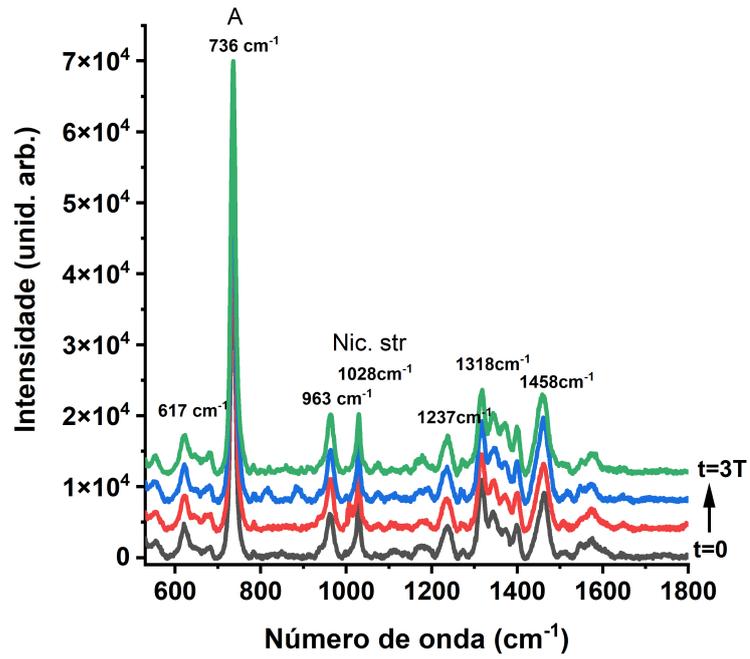
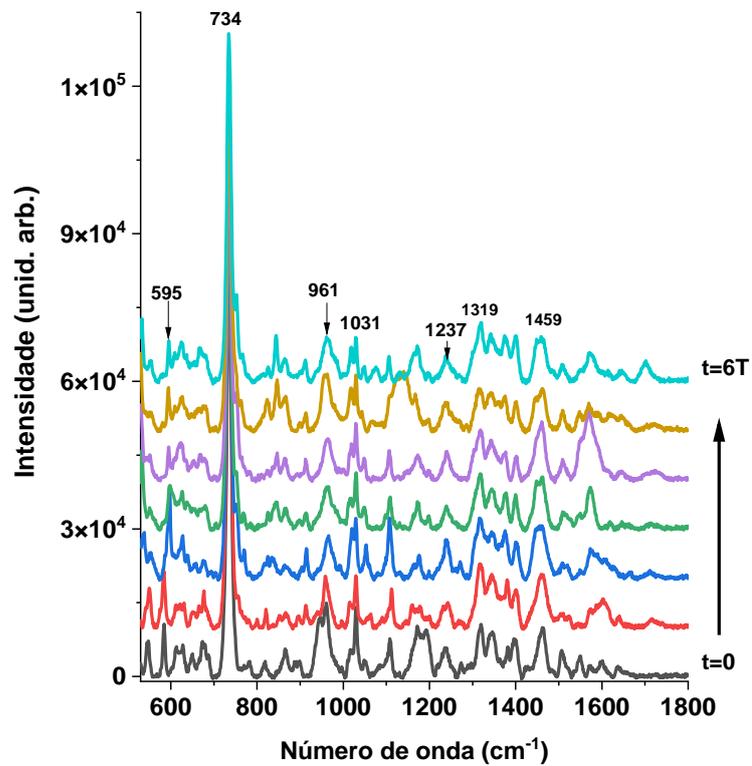


Figura 31 – Espectros SERS de NAD sobre a matriz de nanocilindros de 63 nm excitada por fonte laser de 785 nm com potência de 70 nW (a). Mapas 2D de espectros SERS usando a escala do pico mais intenso (b) e usando a metade da escala do pico mais intenso (c).



(a)



(b)

Figura 32 – Espectros SERS de NAD com excitação laser de 785 nm e potência de $700 \mu\text{W}$ sobre filme fino composto por *cluster* de nanoesferas de Au de 80 nm (a) e 40 nm (b).

Média GLCM [Eq.(3.1)]:

$$\eta = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} iP(i, j) \quad (3.1)$$

Variância GLCM [Eq.(3.2)]:

$$\sigma = \sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} (i - \eta)^2 P(i, j) \quad (3.2)$$

Correlação GLCM [Eq.(3.3)]:

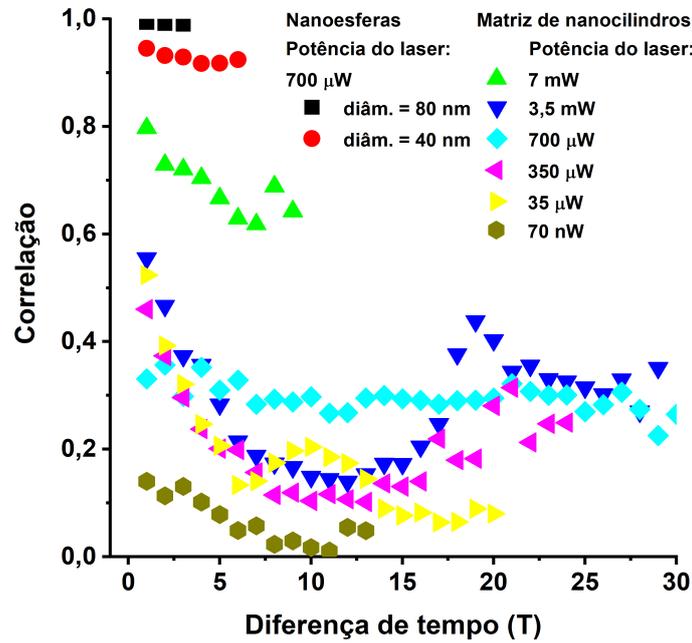
$$\Gamma = \frac{\sum_{i=0}^{N_g-1} \sum_{j=0}^{N_g-1} (i - \eta)(j - \eta)P(i, j)}{\sigma^2} \quad (3.3)$$

Onde: N_g é o número de tons de cinza; $P(i,j) = P(i,j;d)$: definiu a frequência normalizada com a qual d é a distância que separa duas células vizinhas (resolução) na imagem; uma com tom de cinza i e outra com tom de cinza j . No presente trabalho, se a correlação é em função do tempo, d é o intervalo de tempo T de uma varredura, se a correlação é em função da frequência (número de onda), d é a resolução do espectrômetro Raman (cm^{-1}).

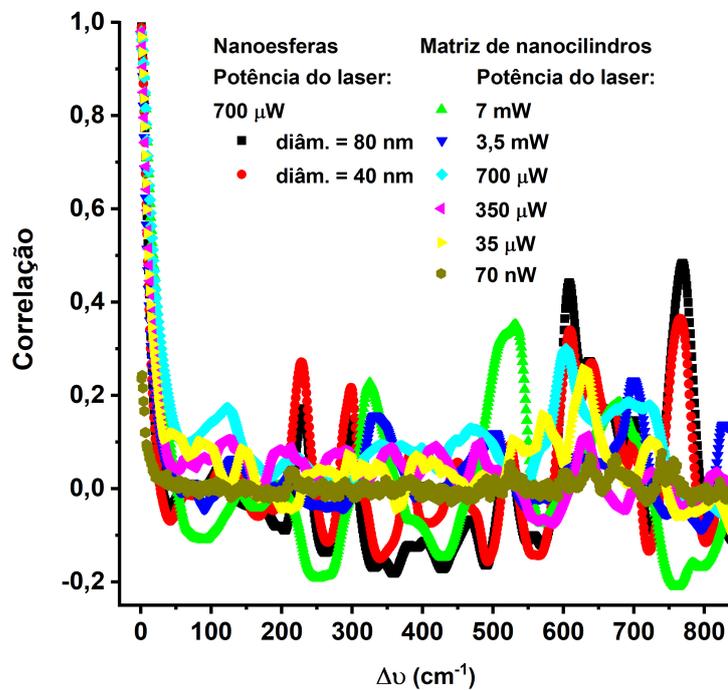
Ferramentas GLCM da plataforma Matlab R2015a foram usadas para determinar a correlação ao longo do tempo e o deslocamento dos números de onda. Para esta tarefa, foi definido o valor $N_g = 200$, uma vez que valores maiores que este não causam efeitos significativos nos resultados. Note que o limite do nível de cinza foi considerado acima do nível do sinal de ruído dos espectros Raman. Portanto, foi assegurado que os valores de correlação determinados correspondem apenas às intensidades das bandas Raman. As Figuras 33a e 33b mostram a correlação de flutuação de espectros Raman ao longo do tempo e o deslocamento do número de onda, respectivamente.

Na Figura 33a, a correlação ao longo do tempo dos espectros SERS dos *clusters* de nanoesferas de 80 nm é próximo de 1. Para os *clusters* de nanoesferas de 40 nm, esta correlação é de cerca de 0,93 e quase constante ao longo do tempo. Nesta mesma figura, para a amostra de nanocilindros de 63 nm, a correlação ao longo do tempo depende da potência do laser de excitação. Como descrito anteriormente, a superfície SERS desta amostra apresentou linhas Raman altamente flutuantes. Há um alto nível de correlação (0,8 a 0,6) para potência de 7 mW. No entanto, os valores diminuem quando a potência do laser diminui para um nível próximo de zero a 70 nW de potência.

As correlações em função do deslocamento do número de onda ($\Delta\nu$) apresentaram valores altos para deslocamento próximos de zero (Fig. 33b). Isto era esperado uma vez



(a)



(b)

Figura 33 – Coeficiente de correlação GLCM em função de deslocamento no tempo (a) e deslocamento no número de onda (b). Aqui a distância temporal mínima é de $T=20$ segundos. T é o tempo necessário para adquirir o espectro de uma varredura Raman gravada. A distância mínima do número de onda é $\Delta\nu = 1 \text{ cm}^{-1}$, que corresponde à resolução do espectrômetro.

que cada banda Raman tem largura finita. Entretanto, em deslocamentos de distâncias maiores do que a largura das bandas Raman (20 cm^{-1}), a correlação diminui para cerca de zero. Neste caso, a distância do deslocamento é diretamente relacionada à distância de separação espectral entre diferentes bandas Raman. A correlação para nanoesferas de 40 e 80 nm mostrou uma característica oscilante com alguns picos positivos. Estes picos estão nas distâncias 229, 299, 608 e 765 cm^{-1} , e foram perfeitamente relacionados às bandas Raman com estas distâncias. Por exemplo, as correlações dos picos em 229 e 299 cm^{-1} estão de acordo com a distância de separação entre o pico Raman em 736 cm^{-1} e 963 cm^{-1} e entre 736 cm^{-1} e 1028 cm^{-1} , respectivamente (Figs. 32a e 32b).

Picos com correlação negativa ou anticorrelação estão relacionados a comportamentos opostos na evolução de suas intensidades, *i.e.*, enquanto um aumenta de intensidade o outro diminui, portanto, se uma banda aumenta, a outra diminui. Um exemplo é o primeiro pico de anticorrelação ocorrido em 270 cm^{-1} . Este pico está de acordo com o comportamento de correlação entre as linhas Raman em 963 cm^{-1} e 1237 cm^{-1} , que estão separadas por 274 cm^{-1} (veja as Figs. 32a e 32b). Este comportamento oscilante do coeficiente de correlação concorda com a correlação de alto valor ao longo do tempo (Fig. 33a). No caso da matriz de nanocilindros, o coeficiente de correlação mostrou comportamento oscilante quando a potência de excitação do laser foi de 7 mW. A correlação tende a zero para potências menores, que também corresponde ao comportamento da correlação ao longo do tempo.

As flutuações das linhas Raman em nossa amostra são eventos altamente randômicos. Portanto, as flutuações não acontecem apenas com certas linhas Raman bem definidas, como observado por Carnegie *et al.* e Benz *et al.* (105, 171). Ao contrário, nossos resultados mostraram que novas linhas Raman apareceram a cada nova varredura gravada.

Neste ponto, as flutuações altamente randômicas podem ser devido a existência de diferentes modos vibracionais em moléculas NAD. Em condições normais, alguns deles são ativos apenas em infravermelho e outros apenas ativos em Raman (167). Entretanto, com a molécula imersa em um intenso campo próximo oriundo do plasmon localizado, estas regras podem ser quebradas. Isto ativa tanto os modos ativos apenas em infravermelho quanto os ativos apenas em Raman (171). Na Tabela 4 do Apêndice A constam as atribuições das principais linhas Raman identificadas nos resultados com as flutuações SERS. Algumas linhas Raman não foram reportadas na literatura, mas aparecem no presente trabalho.

Ainda é controversa a origem dos efeitos de alta intensidade SERS e de flutuações

no tempo (105, 171–175). A simulação que considerou apenas o laser de excitação, o diâmetro e a periodicidade dos nanocilindros (Fig. 24a) resultou em uma intensificação de oito vezes comparado com o espectro Raman (Fig. 22) e, portanto, não podia explicar a intensificação de mais de sessenta vezes obtida nos resultados experimentais.

Diante desta discrepância, foram realizados cálculos teóricos considerando a existência de protuberâncias sobre a superfície dos nanocilindros, onde estas protuberâncias são esféricas de 2 nm de raio. Para esta tarefa foi utilizada a plataforma Lumerical FDTD e a Figura 34a mostra a intensificação de campo simulada. A linha preta é o espectro da intensidade de campo próximo corresponde a uma matriz de nanocilindros com protuberâncias na extremidade superior. A linha vermelha é o espectro da intensidade de campo próximo correspondente a uma matriz de nanocilindros sem protuberâncias. A intensidade de campo é adimensional uma vez que é relativa à luz de excitação. A intensidade máxima de campo próximo de matriz sem protuberâncias é cerca de 8 vezes e com grande largura de banda (veja também a Fig. 24a). Contudo, a matriz com protuberâncias apresentou intensificação de campo de cerca de 340 vezes (Fig. 34a), este nível de intensificação está de acordo com os resultados experimentais. Logo, no texto que segue um possível mecanismo de intensificação foi proposto onde considerou-se a existência de protuberâncias sobre a superfície dos nanocilindros. Estas protuberâncias atuam como picocavidades plasmônicas capazes de intensificar o campo próximo em mais de 300 vezes. Cavidade plasmônica é um sistema optomecânico capaz de amplificar a intensidade do campo próximo, vários trabalhos reportam cavidades plasmônicas bem como seu mecanismo de amplificação (176–178).

Nanocilindros com protuberâncias mostraram níveis de intensificação de campo próximo em torno de 340 vezes, localizada em 796 nm e com largura de banda de cerca de 30 nm, isto dá um fator de qualidade de banda de plasmon de cerca de $Q=27$ (Apêndice B). Este valor é considerado alto na área plasmônica. O valor é comparável ao fator de qualidade de uma cavidade óptica, tal como o da cavidade Fabry-Perot (176). Este plasmon também está fortemente localizado no espaço, como mostrado na Fig. 34b. Note que as características espectrais, tais como posição, largura e intensidade desta banda de plasmon, dependem dos parâmetros e periodicidade do nanocilindro. Isto é demonstrado nos cálculos teóricos dos espectros de campo próximo para todas as estruturas utilizadas neste estudo (Fig. 34c).

Como visto na Figura 34a, o pico do espectro da matriz de nanocilindros de 63 nm com protuberâncias (Fig. 34a) está localizado em $\lambda = 796$ nm. O laser de excitação usado nos ensaios com flutuação Raman foi de $\lambda = 785$ nm. Portanto, a energia do plasmon está

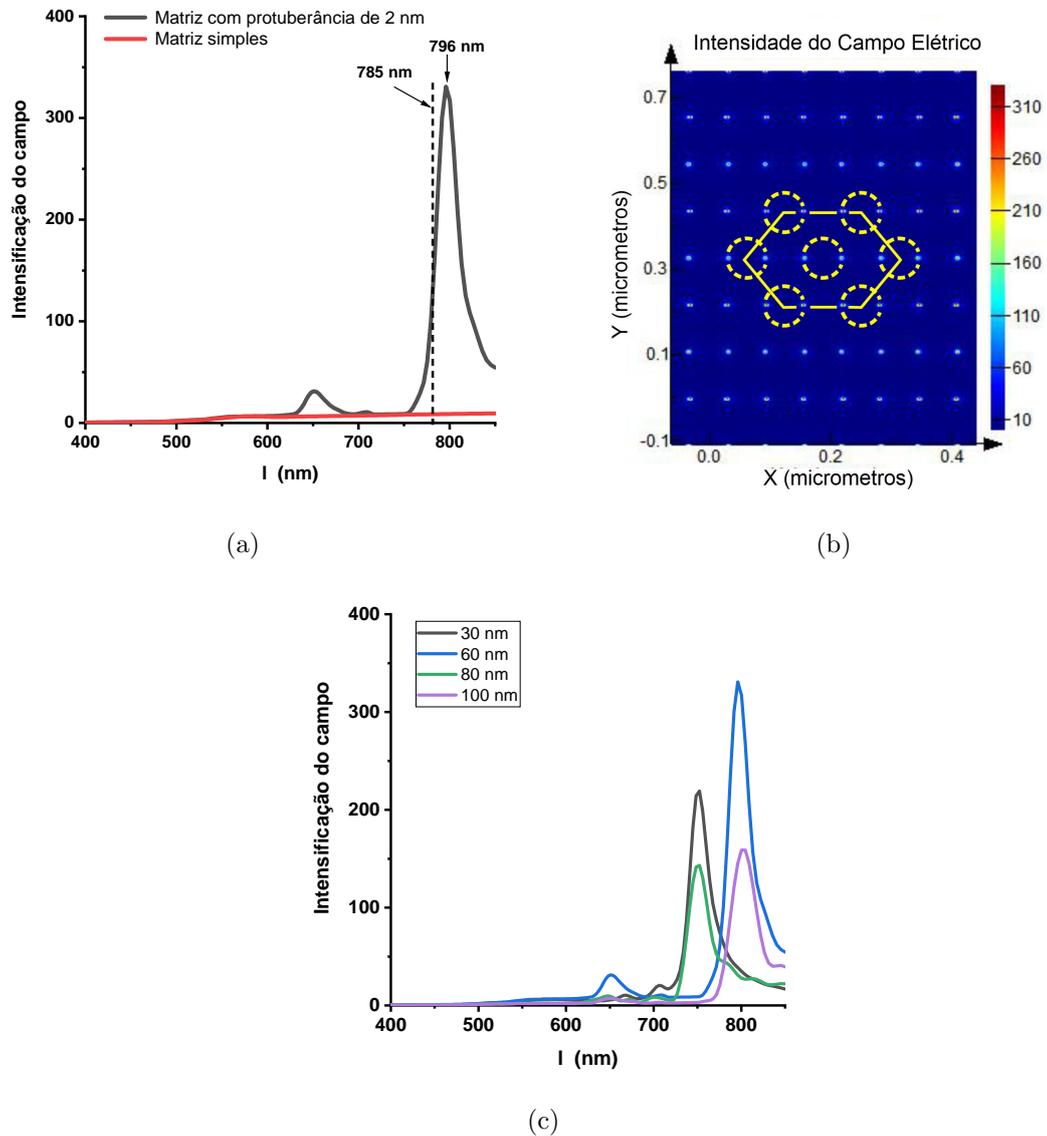


Figura 34 – (a) Intensidade do campo elétrico próximo nas matrizes de nanocilindros de aproximadamente 60 nm com protuberância de 2 nm (linha preta) e sem protuberâncias (linha vermelha). (b) Imagens da intensidade do campo próximo da matriz com uma protuberância em 796 nm, que é a posição do pico da linha preta no espectro em (a) - a linha amarela indica a célula unitária de nanocilindros. (c) Espectros do campo elétrico próximo teórico das matrizes com nanocilindros de aproximadamente 30 nm, 60 nm, 80 nm e 100 nm obtidos por meio da plataforma Lumerical FDTD.

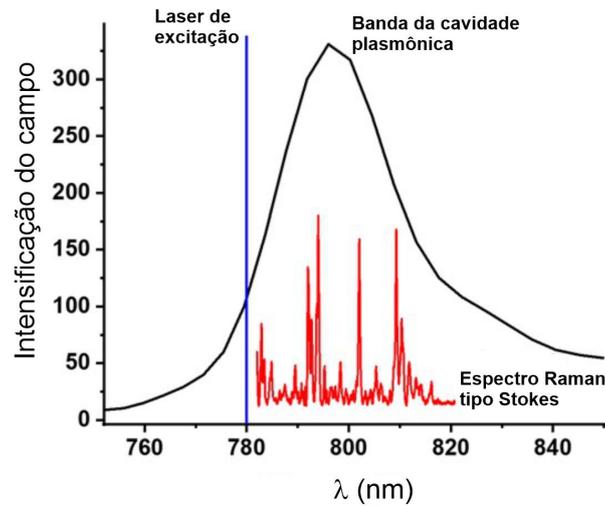


Figura 35 – Representação esquemática das posições espectrais de excitação laser, banda da cavidade do plasmon (Fig. 34a) e espectro Raman Stokes da NAD. A figura mostra o espectro real de banda do plasmon de matriz com pequena protuberância (menor do que 2 nm) sobre a superfície dos nanocilindros.

deslocada para o vermelho em relação à fonte de luz de excitação, e a distância de energia entre 785 nm e 796 nm é cerca de 1106 cm^{-1} (Eq. B.5). Considerando que a largura de banda do plasmon é cerca de 2946 cm^{-1} ($\Delta\lambda = 30 \text{ nm}$) (Eq. B.4), então a faixa espectral dos espectros Raman Stokes das moléculas NAD (530 cm^{-1} até 1800 cm^{-1}) está dentro da banda do plasmon. Isto está ilustrado na Fig. 35. Se estas condições são satisfeitas, a alta intensificação SERS na amostra pode ser explicada pelo mecanismo de intensificação de ação reversa dinâmica (5, 176, 179, 180). Neste modelo, a cavidade de plasmon e os modos vibracionais de moléculas são considerados como um sistema optomecânico. Portanto, o acoplamento entre os modos vibracionais e modos plasmônicos é considerado como um parâmetro de interação (5, 105, 179, 180).

As cavidades plasmônicas seriam pequenas protuberâncias sobre as matrizes de nanocilindros de Au em nosso caso. Nesta abordagem, o hamiltoniano total do sistema é expresso por $\hat{H} = \hat{H}_c + \hat{H}_v + \hat{H}_{int} + \hat{H}_L$. Onde \hat{H}_c e \hat{H}_v são o hamiltoniano das cavidades plasmônicas e o hamiltoniano vibracional da molécula, respectivamente; \hat{H}_{int} é o hamiltoniano de interação coerente entre os modos plasmônicos e os modos vibracionais da molécula; e \hat{H}_L é o hamiltoniano da luz incidente (excitação) (5, 179, 180). Como visto, o plasmon formado nos nanocilindros consiste no movimento oscilante e coordenado dos elétrons livres do ouro. Movimentos oscilantes de elétrons em nanopartícula podem ser aproximados ao movimento de um oscilador harmônico quântico (Anexo C). A vibração molecular também é um movimento oscilatório, então também podemos aproximar seu hamiltoniano ao do oscilador harmônico quântico. Assim, os plasmons nas picocavidades

estão associados à criação e aniquilação de excitações previstas no modelo do Anexo C. Logo, a Equação C.11 serviu de base para a dedução das equações 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7 que definem os termos \hat{H}_c , \hat{H}_v , \hat{H}_{int} e \hat{H}_L , respectivamente.

$$\hat{H}_C = \omega_C \hbar \left(\hat{a} \hat{a}^\dagger - \frac{1}{2} \right) \quad (3.4)$$

$$\hat{H}_v = \omega_v \hbar \left(\hat{b} \hat{b}^\dagger - \frac{1}{2} \right) \quad (3.5)$$

$$\hat{H}_{int} = g \hbar \hat{a} \hat{a}^\dagger (\hat{b} + \hat{b}^\dagger) \quad (3.6)$$

$$\hat{H}_L = iE[\hat{a}_L^\dagger \exp(-i\omega_L t) - \hat{a}_L \exp(i\omega_L t)] \quad (3.7)$$

Onde: \hat{a} , \hat{a}^\dagger , \hat{b} e \hat{b}^\dagger são os operadores bosônicos de criação e aniquilação, g é o parâmetro optomecânico que depende da frequência da cavidade plasmônica (ω_C) e da polarizabilidade Raman da molécula (5, 179, 180). ω_v é a frequência angular dos fônons moleculares e ω_L é a frequência do laser de excitação. As equações de Langevin podem ser usadas para determinar a evolução temporal de \hat{a} e \hat{b} da qual é obtida a população de fótons Stokes e anti-Stokes (5, 179, 180). Portanto, a ação reversa dinâmica poderia ser resumida da seguinte forma: Primeiro, a vibração molecular atua no comportamento ressonante da cavidade plasmônica de tal forma que a frequência ressonante do plasmon na cavidade exibe um comportamento dispersivo. Então, o modo plasmônico retorna a ação (*back action*) sobre a vibração do oscilador, e este mecanismo é especialmente favorável quando a energia do laser está deslocada para o azul em relação à energia ressonante do plasmon na cavidade. Este mecanismo de ação reversa então induz uma amplificação paramétrica que poderia aumentar a intensidade do efeito SERS (5, 179, 180).

Se assumirmos que existem pequenas protuberâncias (menores que esferas de 2 nm), a energia do plasmon está deslocada para o vermelho em relação à energia da fonte de luz de excitação (Figs. 34a e 35). Logo, o mecanismo de ação reversa dinâmica pode explicar com sucesso a alta intensidade SERS observada em nossos experimentos.

As protuberâncias sobre os nanocilindros seriam, portanto, picocavidades plasmônicas responsáveis pela elevada intensificação SERS através do mecanismo de ação reversa dinâmica. Isso explica a intensificação, mas não explica as flutuações espectrais. Foi reportado que picocavidades plasmônicas podem se formar e se destruir espontaneamente de modo randômico em temperatura ambiente (105, 181), isso poderia originar os eventos de flutuação SERS. Ou seja, os fenômenos de flutuação podem ter acontecido devido à formação e à destruição espontânea e estocástica destas protuberâncias. Isto poderia

acontecer visto que os experimentos ocorreram em temperatura ambiente (300 K). Em outras palavras, as protuberâncias poderiam ser formadas por flutuações térmicas locais sobre as superfícies dos nanocilindros (105, 175, 181). Em nossos resultados, a flutuação mostrou comportamento mais estocástico quando a potência do laser foi reduzida. Portanto, a formação e a destruição randômicas das protuberâncias são quase independentes da potência do laser.

As posições espectrais da Figura 35 mostram que o mecanismo de ação reversa dinâmica também pode explicar as baixas intensidades SERS quando a fonte de excitação laser é 633 nm e 532 nm, pois a distância entre os valores destas energias de excitação e a posição do plasmom das picocavidades ($\sim 20325 \text{ cm}^{-1}$) não satisfazem a condição de estar próximo dos valores de energia dos modos vibracionais da molécula NAD ($\leq 1800 \text{ cm}^{-1}$) nestes experimentos. A explicação foi que estas energias são muito distantes (deslocadas para o azul) do pico da cavidade de plasmon (796 nm), mas o laser 785 nm está próximo do pico do plasmon. Ou seja, a excitação com laser de 785 nm satisfaz a condição desejada para uma ação reversa dinâmica eficiente de intensificação Raman Stokes. Isto ocorre porque a melhor condição aconteceu quando o pico da cavidade de plasmon está deslocado para o vermelho em relação ao laser em $\Delta = \omega_L - \omega_C = \omega_m$, onde ω_m corresponde à frequência angular do modo vibracional molecular. Como em nossa amostra as linhas Raman Stokes estão na região da banda da cavidade de plasmon (previsto teoricamente para uma pequena protuberância) quando excitado com um laser de 785 nm, é dada a condição necessária para uma intensificação paramétrica (Fig. 35). As discussões acima sugerem fortemente que as flutuações SERS em nossa amostra são devido à formação e à destruição randômicas de pequenas picocavidades, como sugerido por Wang e Rothberg, Carnegie *et al.* e Lindquist *et al.* (105, 175, 181).

As flutuações SERS de NAD na matriz de nanocilindros de 63 nm de diâmetro foram altamente randômicas ao longo do tempo. Além disso, as frequências vibracionais não mostraram qualquer linha Raman persistente. Estas flutuações são muito diferentes daquelas reportadas na literatura em que se observou linhas Raman com efeito piscante e algumas outras linhas Raman persistentes sem mudanças em suas frequências vibracionais (105, 181).

Em nossa amostra, a alta intensidade SERS acompanhada por fortes flutuações randômicas no tempo sugerem a possível formação randômica e destruição também randômica de pequenas protuberâncias sobre a superfície dos nanocilindros de Au. Sobre a superfície dos nanocilindros, estas pequenas protuberâncias atuam como picocavidades plasmônicas, como indicado pelo cálculo do campo próximo nestes tipos de nanoestrutu-

ras (Fig. 34). Entretanto, a forte flutuação nas frequências vibracionais juntamente com a inexistência de qualquer linha Raman persistente sugerem fortemente que moléculas NAD não são adsorvidas por uma ligação específica. Este comportamento não poderia ser explicado considerando apenas a formação e destruição de picocavidades. Neste sentido, também será necessário considerar possíveis movimentos espaciais e rotacionais da molécula. Neste caso, a flutuação SERS também pode depender da difusão molecular (175, 182) e/ou mudanças conformacionais das moléculas na região do *hot spot*, como reportado em (105, 175). A questão é: quais forças podem potencializar este tipo de movimento na molécula NAD? No texto que segue, é sugerido um possível mecanismo para a dinâmica mecânica de moléculas NAD sobre a superfície da matriz de nanocilindros de Au.

Considere que uma linha Raman persistente está relacionada ao modo vibracional pertencente à ligação da molécula adsorvida estacionariamente à superfície do nanocilindro de Au. Logo, a flutuação das frequências vibracionais poderia ser devido ao movimento mecânico da molécula NAD, como já sugerido. Este movimento ocorreria juntamente com a formação e/ou destruição da picocavidade. A flutuação da frequência mostrou-se mais pronunciada em baixas potências do laser de excitação. Por esta razão, o movimento browniano de moléculas NAD pode oferecer apenas uma baixa contribuição às flutuações nas frequências dos modos.

Neste sentido, o movimento mecânico (deslocamento e/ou rotação) poderia ser devido à intensidade de campo com alto gradiente proveniente das picocavidades. A razão seria porque as forças mecânicas próximas dos centros das picocavidades sobre as moléculas são altas o suficiente para promover movimentos mecânicos da NAD. Foi reportado que a energia potencial mecânica de atração para moléculas próximas ao *hot spot* é proporcional à intensidade do campo elétrico (3.8).

$$\langle U \rangle = -\frac{1}{4} \text{Re}(\alpha) |E|^2 \quad (3.8)$$

A partir da qual é determinada a força gradiente [Eq. (3.9)]:

$$\langle F \rangle = -\nabla \langle U \rangle = \frac{1}{4} \text{Re}(\alpha) \nabla |E|^2 \quad (3.9)$$

Onde $\text{Re}(\alpha)$ é a parte real da polarizabilidade molecular α de moléculas próximas ao *hot spot*, e $\langle \rangle$ representa a média temporal (177, 183). As equações (3.8) e (3.9) são válidas somente quando a dimensão da molécula é muito menor que o comprimento de onda óptico

do campo elétrico (λ). Considerou-se aqui o diâmetro efetivo da molécula como sua dimensão espacial. No sistema do presente estudo, esta condição é totalmente satisfeita uma vez que moléculas NAD têm extensão espacial de duas dezenas de angstroms (147–151) e as protuberâncias do plasmon estão localizadas em $\lambda = 796$ nm. Para cálculo teórico aproximado de $\langle U \rangle$ e $\langle F \rangle$, considerou-se $\alpha = 13,1 \text{ \AA}^3$. Esta é a polarizabilidade da parte da adenina da molécula NAD (156) em perfil espacial unidimensional do campo elétrico próximo representado por $|E|^2$. Este campo é intenso em 796 nm devido à ressonância da cavidade de plasmon induzida pela protuberância esférica de 2 nm (Fig. 34a). Nestes cálculos, também se considerou que a amostra foi excitada com laser de 700 μW de potência. O laser foi focalizado em uma área de 1 μm^2 resultando em 700 $\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$. A intensidade no *hot spot* foi corrigida para a fração de área efetiva ocupada pelos *hot spots* dentro da célula unitária. Logo, a plataforma Lumerical FDTD foi utilizada no cálculo do campo próximo e a área efetiva (A_{eff}) foi calculada usando as Equações 3.10 e 3.11 (184):

$$A_{eff} = \frac{1}{\text{Max}[W(r)]} \int_{\text{célula unitária}} W(r) dA \quad (3.10)$$

$$W(r) = \frac{1}{2} \text{Re} \left\{ \frac{d[\omega \varepsilon(r)]}{d\omega} \right\} |E|^2 + \frac{1}{2} \mu_0 |H|^2 \quad (3.11)$$

Onde: $W(r)$ é a densidade de energia eletromagnética como uma função da posição r , $\text{Max}[W(r)]$ é o valor máximo desta densidade. A é área da célula unitária, $\varepsilon(r)$ é a permissividade elétrica do meio em função de r , e ω é a frequência angular do sinal de luz. A fração de área ocupada por *hot spots* foi $f_{a_{hs}} = A_{eff}/A_{\text{célula unitária}} = 1,79 \times 10^{-2}$. A intensidade do campo no *hot spot* foi, portanto, igual a $f_{a_{hs}} \times 700 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$. Os resultados destes cálculos estão mostrados na Fig. 36, onde K_B é a constante de Boltzmann, T_K é a temperatura na escala Kelvin, e $U/10K_B T_K$ é adimensional. O eixo horizontal é a distância em nm sobre um nanocilindro, onde o ponto 0 corresponde ao vale de uma picocavidade (ou pico de uma protuberância).

A curva $U/10K_B T_K$ tem seu valor mínimo próximo de 3,3. Isto significa que a energia potencial $|U|$ é mais de 30 vezes maior que a energia térmica $K_B T_K$ em temperatura ambiente (300 K). Este resultado mostrou que o *hot spot* de energia eletromagnética superou a energia térmica. Portanto, qualquer movimento mecânico de moléculas próximas destes *hot spots* será governado pela força gradiente do campo próximo e não pelo movimento browniano. A curva em vermelho corresponde à força gradiente obtida de $\langle F \rangle = -\nabla \langle U \rangle$. O resultado mostrou que as forças máximas atingem 8,5 nN, que é maior do que o relatado

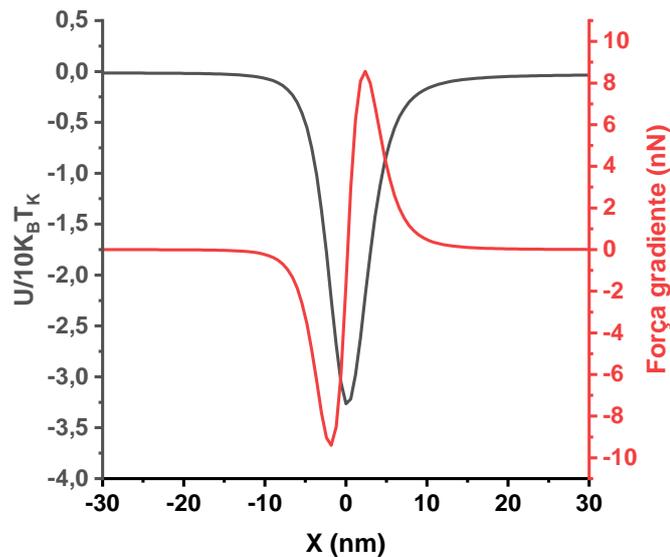


Figura 36 – A linha preta corresponde a energia potencial normalizada da molécula NAD induzida pela intensidade do campo elétrico de *hot spot* das protuberâncias. A normalização foi mais de 30 vezes maior do que a energia térmica em temperatura ambiente (300 K). A linha vermelha corresponde à força gradiente sobre moléculas NAD próximas à região de *hot spot*, dada em nanonewtons.

na literatura (177, 183).

A partir da discussão acima, sugeriu-se que as altas flutuações SERS sobre as frequências dos modos vibracionais poderiam estar relacionadas à ação de força gradiente sobre a NAD. A força gradiente é induzida por criação e destruição randômicas de picocavidades. Esta força pode deslocar ou rotacionar as moléculas NAD mudando suas configurações sobre a superfície de picocavidades. Note que a flutuação sobre as frequências dos modos vibracionais ainda é observada em baixa potência do laser de excitação (70 nW). Este evento é esperado apenas se as picocavidades são menores que 2 nm na discussão teórica.

3.2.4 Espectros SERS da molécula NAD depositadas sobre um arranjo de nanocilindros de Au construídos na seção transversal do núcleo de fibra óptica multimodo.

Os espectros SERS fornecem informações estruturais de moléculas e podem ser utilizados para definir sua identidade ao compor um tipo de “impressão digital”. Logo, aplicações em sensores altamente sensíveis e seletivos poderão ser implementadas por meio de sistemas plasmônicos. Dentro deste cenário, na área biomédica existe a necessidade de monitorar *in situ* diferentes eventos moleculares. Neste campo, sondas com dispositivos plasmônicos oferecem excelentes oportunidades. No presente trabalho foram fabricados arranjos de nanocilindros sobre a seção transversal do núcleo de fibra óptica

multimodo (Seção 2.2) para se obter espectros SERS da molécula NAD.

Como no caso anteriormente estudado, foi depositada apenas uma monocamada de moléculas NAD sobre a superfície do arranjo de nanocilindros na fibra óptica. Três espectros foram obtidos sucessivamente na mesma região. Como referência, utilizou-se um espectro do núcleo da fibra com NAD depositada mas sem a presença de nanocilindros. O laser foi focalizado diretamente sobre a nanoestrutura com NAD já depositada (Fig. 37).

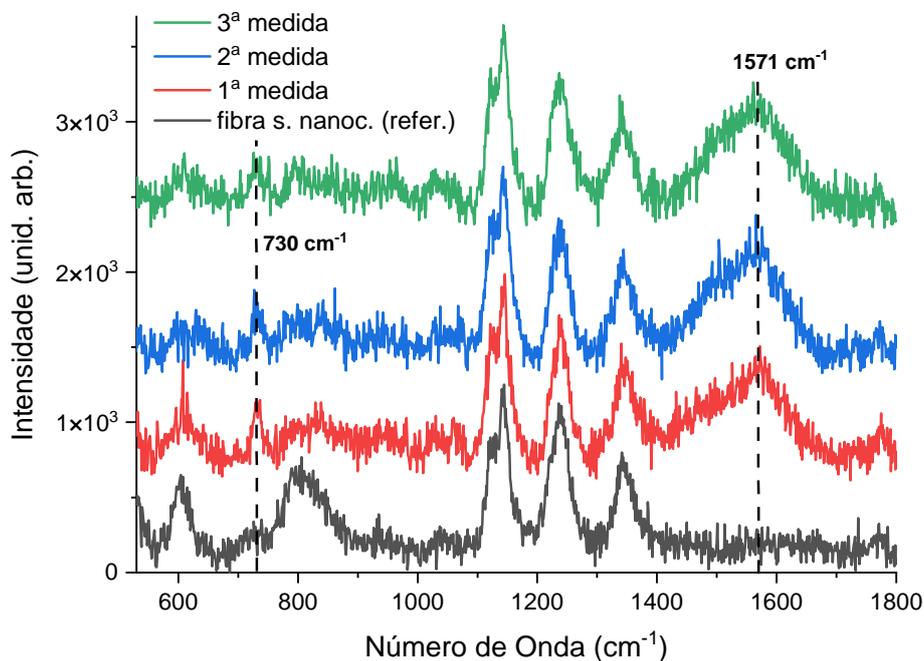


Figura 37 – Espectro obtido no núcleo da fibra óptica sem nanoestruturas (linha preta) e espectros obtidos em sequência referentes ao núcleo da fibra óptica com matriz de nanocilindros. Laser de 785 nm e 7 mW, objetiva de 50× e N.A. 0,53.

Na Figura 37, no espectro correspondente somente ao núcleo da fibra, aparecem bandas Raman em 603 cm^{-1} , 803 cm^{-1} , 1141 cm^{-1} correspondentes aos modos vibracionais de flexão das ligações Si-O-Si, estiramento simétrico de Si-O-Si e estiramento assimétrico do Si-O-Si, respectivamente. Já, as bandas em 1236 cm^{-1} e 1343 cm^{-1} , podem ser atribuídos a modos de vibração de estruturas de anéis do SiO_2 afetáveis por impurezas do tipo BO_3 (185). Os espectros da fibra com nanocilindros de Au e moléculas de NAD adsorvidas apresentam apenas duas bandas Raman do núcleo da fibra, uma em 730 cm^{-1} atribuída ao modo vibracional da adenina e outra banda larga com pico em 1571 cm^{-1} atribuída ao modo vibracional de flexão da ligação N-H (Fig. 37). A elevada largura da banda em 1571 cm^{-1} pode ser atribuída à contribuição de outros modos vibracionais da NAD, já que nesta região foram identificadas várias linhas Raman (ver atribuição de linhas Raman da

NAD, Tabela 4 no Apêndice A). Importante mencionar que nestes ensaios não foi possível visualizar efeitos de flutuação. Os resultados acima discutidos mostram o potencial que estruturas plasmônicas fabricadas em fibras ópticas podem proporcionar na fabricação de sondas de detecção molecular principalmente na área de biomedicina. No entanto, devido às linhas Raman próprias do núcleo, sua aplicação como sonda se torna um desafio. Contudo, para moléculas com frequências de vibração dos seus modos acima de 1400 cm^{-1} a fibra óptica com núcleo de sílica apresenta-se adequada, já que seu modo vibracional de mais alta energia está situada em 1343 cm^{-1} . Neste caso, é necessário estudar novos materiais para o núcleo da fibra óptica de tal forma a minimizar seu espalhamento Raman.

3.3 Aplicação de dispositivos plasmônicos para intensificação Raman da GSH

3.3.1 A importância da GSH

A molécula glutathiona (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina), conhecida por GSH, é um tripeptídeo e o tiol intracelular mais abundante em sistemas biológicos. Esta molécula é composta por três aminoácidos: glutamato, cisteína e glicina. A GSH possui baixo peso molecular ($307,32\text{ g/mol}$) e participa direta ou indiretamente de muitos fenômenos biológicos importantes, tais como síntese proteica e de DNA, atividades enzimáticas, transporte, metabolismo e proteção celular (186).

Há quatro décadas a GSH desperta interesse em pesquisadores de vários segmentos devido à sua relevância em diversas áreas, como desenvolvimento de medicamentos, antioxidante e atuação no potencial redox em células e tecidos (186–188). Em mamíferos, esta molécula atua na primeira linha de defesa contra materiais tóxicos (189). Além disso, muitas doenças têm uma relação próxima com os níveis de GSH, tais como mal de Parkinson, fibrose cística, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS - *acquired immunodeficiency syndrome*), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV - *Human Immunodeficiency Virus*), mal de Alzheimer e câncer (190–196). Outros estudos indicam que em condições normais as concentrações de GSH e de espécies reativas ao oxigênio estão bem equilibradas nos tecidos. No entanto, em células tumorais este equilíbrio não ocorre porque estas células sintetizam GSH e a excretam. Ou seja, a relação entre GSH e espécies reativas ao oxigênio estão associadas à atividade celular (16, 197, 198). Neste sentido, Zhang *et al.*, Xu e Thornalley observaram que em células cancerígenas, os níveis de glutathiona indicam a quantidade de estresse pela qual uma célula está passando (199, 200). Em

adição, Shin *et. al.* mostraram que uma alta concentração de GSH interfere na eficácia de terapias anticâncer (201).

Devido à sua conhecida atuação como agente antioxidante em sistemas biológicos, a GSH se liga a radicais livres e peróxidos, e desta forma, previne danos à célula. Esta molécula é o agente antioxidante mais eficaz para manter o potencial redox em células, tecidos e compartimentos individuais (187, 188). Assim como visto em NAD e NADH, a glutathiona também é a base de importantes reações de oxidorredução em sistemas biológicos. A GSH é a forma reduzida e o GSSG (dissulfeto de glutathiona) é a forma dimérica oxidada da glutathiona em que a oxidação de GSH ocorre por meio de sua ligação -SH no grupo da cisteína (202–205). Este é o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas (Figura 38).

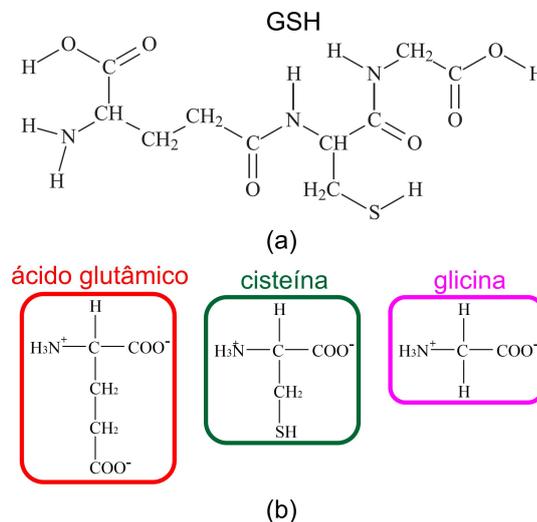


Figura 38 – Estruturas moleculares da GSH (a) (206) e dos aminoácidos que a compõe (b) (207).
Fonte: (206, 207)

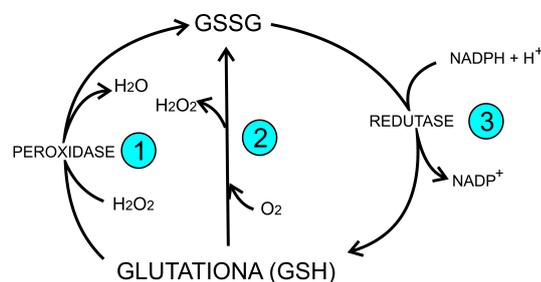


Figura 39 – (1) GSH peroxidase; (2) oxidação da GSH por O₂; e (3) redutase da GSSG.
Fonte: (186)

Dentre os papéis exercidos por GSH e GSSG dentro de células, pode-se destacar a interação com as moléculas NADP (forma oxidada) e NADPH (forma reduzida), onde NADP significa fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo. A Figura 39 ilustra esta interação que ocorre por meio de três reações. Na Reação 1 um processo de peroxidação

converte a GSH em GSSG, conseqüentemente, a redução de H_2O_2 e de outros peróxidos é catalisada. Outro caminho para a oxidação de GSH é a transferência de hidrogênio para o O_2 que resulta em H_2O_2 e GSSG (Reação 2). A redução de GSSG para GSH é mediada por enzimas GSSG (redutase) que utilizam NADPH (Reação 3). Em outras palavras, GSSG sofre redução ao oxidar NADPH. A GSSG também é formada por reações de GSH com radicais livres. A conversão de GSH em GSSG fora da célula também é reportada (186). Contudo, o papel da glutathiona vai muito além das interações com a molécula NAD(P), e devido aos objetivos do presente trabalho, a Figura 39 é apenas um dos processos que envolvem esta molécula. Mais informações fundamentais sobre a glutathiona são encontradas em (186).

Os avanços da nanotecnologia do DNA, de materiais inorgânicos, e de novos métodos de análise e diagnóstico geram uma demanda crescente para a detecção de GSH (16, 208, 209). O maior desafio é a detecção em células devido à baixa concentração, tipicamente na ordem de femto mol/L (10, 95). Alguns exemplos de técnicas de detecção e análise da GSH reportadas na literatura são: análise eletroquímica (210–213), espectrometria de fluorescência (214, 215), espectrometria em ultravioleta e visível (216, 217), espectrometria de massa (218, 219), cromatografia líquida em espectroscopia de massa (220), colorimetria (221–223) e espectroscopia de ressonância magnética (224, 225). Apesar de todas estas técnicas serem adequadas para detectar GSH, elas têm limitações que impedem sua aplicação em muitas áreas, como caros instrumentos de análise, complicadas preparações de amostra ou problemas de degradação. Em uma análise por fluorescência, por exemplo, a amostra pode sofrer fotodegradação ou fotobranqueamento durante as medidas (226).

Já se sabe há algum tempo que a interação entre uma superfície de metal e tióis pode induzir mudanças no índice de refração da superfície, isso torna possível utilizar LSPR para detectar GSH com o grupo $-\text{SH}$ sobre nanopartículas metálicas (227–229). Partindo deste princípio, Li *et al.* fizeram nanopilares de Au recobertos por mPEG-SH (O-[2-(3-mercaptopropionil-amino)etil]-O'-metil-polietileno glicol) e os aplicaram em plataformas de LSPR para a detecção de alguns tióis, incluindo GSH e cisteína (66). Todavia, as curvas dos espectros de absorção tiveram um deslocamento máximo de apenas 4 nm. Por essa razão, o *background* comprometeu as medidas pois foi uma ordem de grandeza maior que o próprio sinal correspondente ao estímulo químico. Os autores buscaram minimizar este problema por meio de um gráfico de extinção diferencial para excluir o *background*.

A LSPR em nanopartículas de Au foi introduzida em sistemas de luminescência eletroquímica com o objetivo de aumentar a sensibilidade à molécula GSH (230). Essa ideia teve início quando Wang *et al.* provaram que nanopartículas de Au envolvidas por SiO_2

e $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ podem intensificar o sinal de luminescência eletroquímica com a formação de plasmon localizado. Então medidas de luminescência eletroquímica foram coletadas, como resultado o sinal de luminescência foi dez vezes maior comparado com medidas sem estes nanocompósitos (231). Com base nestes resultados, Cao *et al.* montaram um experimento semelhante e adicionaram diferentes concentrações de GSH à solução com um luminóforo. Assim, o sinal de luminescência foi intensificado pelo plasmon formado nas nanopartículas de Au e foi possível detectar concentrações de GSH de apenas 5×10^{-16} M (230).

Existe um método de detecção de GSH baseado em LSPR que consiste em agregação de nanopartículas. Neste caso, a agregação de nanopartículas metálicas sofre alterações em presença da GSH, conseqüentemente, isto provoca alterações na distribuição de *hot spots* que podem ser percebidas por medidas. Liu *et al.* desenvolveram uma nanoestrutura de ouro baseada em LSPR destinada à detecção de GSH, a estrutura foi designada núcleo-satélites. Todavia, este método de detecção apresentou alguns inconvenientes, incluindo um longo tempo de resposta de 30 minutos (223).

Atualmente, o nível de GSH pode ser medido de acordo com o grau de alteração do sinal Raman, mas em exame com baixa sensibilidade de todo o tecido biológico e em escala macroscópica (16). Já a SERS é uma técnica suficientemente sensível para detectar moléculas isoladas, porém, a GSH possui baixa polarizabilidade. Esta é uma das explicações de muitas medidas em SERS terem baixa sensibilidade e baixa reprodutibilidade para GSH até os dias atuais. Brambilla *et al.*, por exemplo, obtiveram um sinal elevado na detecção de GSH sobre substrato de prata, mas ainda assim o sinal foi insuficiente para aplicações biológicas reais (232). Por outro lado, no plasma sanguíneo a concentração de GSH é bem maior e está em uma faixa entre 2 e 20 μM (233), assim, Sanchez-Illana *et al.* desenvolveram um método para quantificar a GSH em 2 μL de sangue, para isso aplicaram coloides de prata em SERS e o sinal da glutatona pode ser intensificado de 3 a 4 ordens de magnitude comparado ao Raman (95). Nanoclusters polimórficos de Si com nanoesferas de Au e Au/Pd também foram aplicados na detecção de GSH por SERS em concentração de 10^{-6} M (234). Vijayakumar, Venkatakrishnan e Tan utilizaram níquel para construir uma nanoestrutura semelhante e detectaram concentrações da ordem de 1 pM de GSH por SERS, ambos fabricaram as superfícies com técnicas de fotoionização por luz pulsada (21). A superfície da nanopartícula também pode ser funcionalizada com outras substâncias para intensificar o espalhamento Raman da GSH. Por exemplo, Li *et al.* intensificaram as linhas da GSH ao aplicar neocuproína cúprica sobre nanotigelas de Au-Ag (226).

Devido à baixa polarizabilidade da GSH e, portanto, baixo espalhamento Raman, alguns autores utilizaram uma molécula auxiliar para fazer a detecção indireta da GSH. Nestes casos, o princípio de transdução consiste em “desligar” o efeito SERS em presença da GSH, e desta forma, GSH e GSSG são detectadas. Por exemplo, Zhou e Ding quantificaram diferentes concentrações de glutatona em solução contendo 4-aminotiofenol e 4-mercaptopiridina, onde a GSH atenuava o sinal SERS destas moléculas (15). Em estudo similar, Saha e Jana detectaram a glutatona em concentrações celulares da ordem de femto mol por meio de SERS, mas o problema na detecção de GSH foi a interferência de outras pequenas moléculas de tióis, como cistina e homocistina (10).

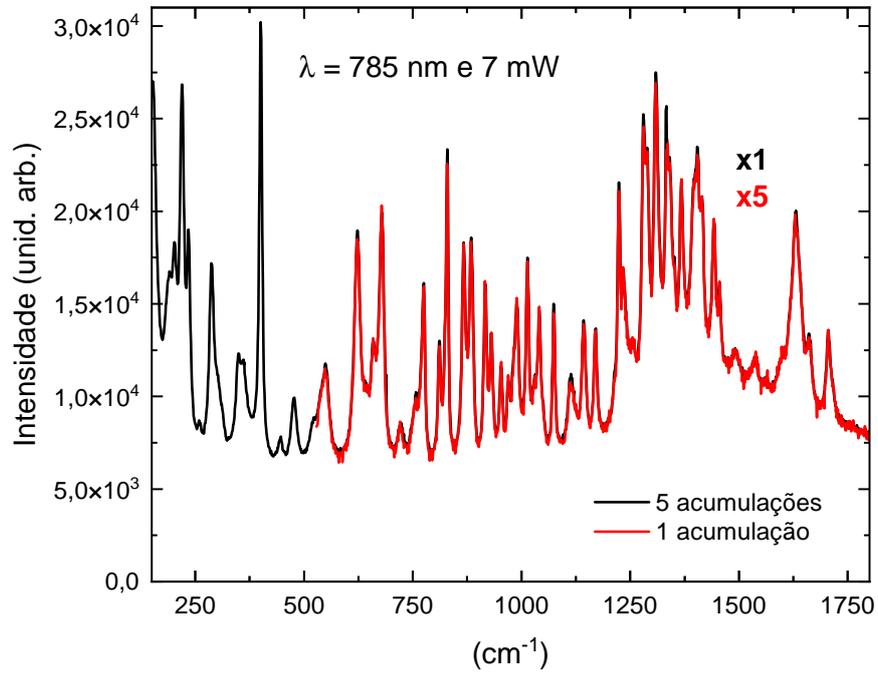
Embora existam muitos trabalhos sobre a detecção de GSH por meio de SERS-LSPR, este assunto permanece atual e relevante. Isto porque, no limite de detecção de apenas uma única molécula, existem eventos de flutuação dos espectros Raman, como os que foram observados em nossos experimentos SERS da molécula de GSH.

3.3.2 Espectros SERS das moléculas de GSH absorvidas na superfície das estruturas plasmônicas de nanocilindros.

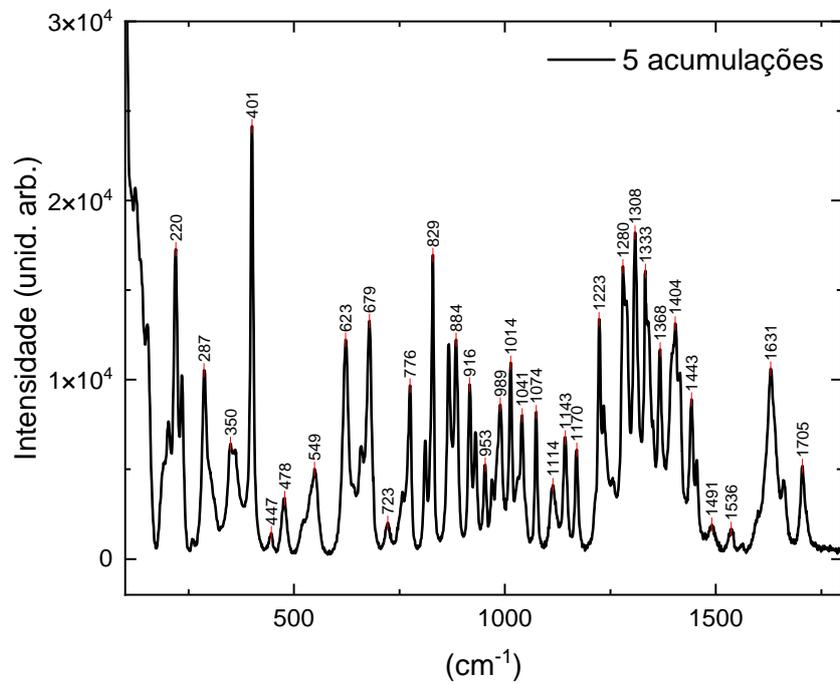
A molécula GSH foi fornecida em forma de pó por Fluka® e não passou por qualquer processo de preparação antes de entrar em contato com o solvente. A GSH foi depositada nas amostras de lâmina de silício pelo mesmo método aplicado à deposição da NAD, inclusive na preparação da amostra e da solução (Seção 3.2.2).

A GSH possui muitos modos Raman ativos como reportado em (109). Com o propósito de comparar o comportamento do espalhamento Raman dos modos vibracionais da molécula de GSH adsorvida sobre os dispositivos plasmônicos, primeiramente foram obtidos os espectros Raman de uma amostra em pó da molécula de GSH para identificar seus principais modos vibracionais. Com esta finalidade colocou-se a GSH em pó diretamente na lâmina de microscópio e obtiveram-se espectros Raman com laser $\lambda=785$ nm e 7 mW de potência, com uma e com cinco acumulações (Fig. 40).

A Figura 40a mostra que o espectro obtido em uma acumulação coincidiu com o obtido em 5 acumulações, como esperado. Isto significa que o perfil do espectro Raman desta molécula é estável, tanto em relação ao espalhamento Raman quanto à fotoluminescência. Nos espectros SERS da GSH em pó não foram observadas flutuações. Após a subtração da linha de base, observou-se a existência de muitos modos vibracionais da GSH com picos dispostos lado a lado, em sua maioria de base estreita (Fig. 40b). As atribuições das linhas Raman da amostra em pó da GSH correspondente à Figura 40b estão apresentadas



(a)



(b)

Figura 40 – (a) Espectro do pó de GSH com uma e com cinco acumulações. (b) Espectro do pó de GSH com cinco acumulações já com sinal de fundo subtraído e com indicação das principais linhas.

detalhadamente na Tabela 5 do ApêndiceA. Na região espectral compreendida entre 900 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} , as linhas Raman são atribuídas aos modos vibracionais dos grupos C-H₂, C-H₃, C-N, C-O, C-C, C=O da molécula de GSH. As linhas na região de 150 cm^{-1} a 900 cm^{-1} são atribuídas a modos vibracionais dos grupos de ligações C-C (ligados a grupos carboxílicos -C(=O)OH), C-S, O-C=O, O-C-C, C-C-S, C-C-C respectivamente (109).

Para a obtenção dos espectros SERS das moléculas de GSH adsorvidas nas estruturas plasmônica, assim como descrito na Seção 3.2.2, apenas uma monocamada (ou menos) de GSH foi adsorvida sobre a superfície dos dispositivos. Para tal fim cada amostra foi lavada em água corrente após sua imersão da solução. Assim como em NAD, em GSH o primeiro passo da investigação foi verificar a influência do diâmetro e da periodicidade dos nanocilindros no efeito SERS. Então foram utilizados dispositivos plasmônicos com nanocilindros de diâmetro de 31 nm, 58 nm e 84 nm (valores efetivos), respectivamente (Tabela 2). A potência do laser de 785 nm foi ajustada em 7 mW (Fig. 41).

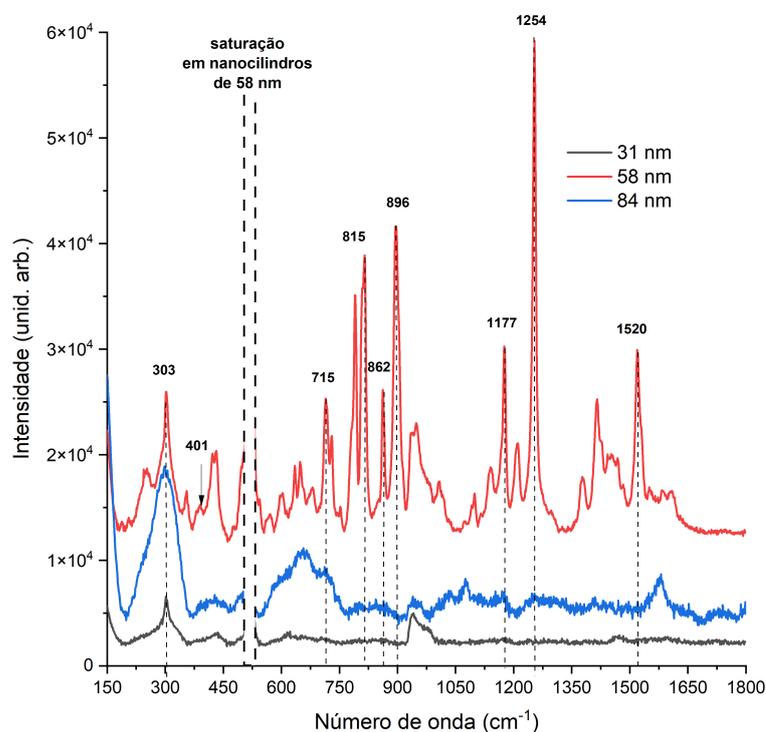


Figura 41 – Espectros SERS de GSH em relação ao diâmetro dos nanocilindros da matriz .

A Figura 41 mostra espectros SERS obtidos em matrizes de nanocilindros de 31 nm, 58 nm e 84 nm de diâmetro. Na matriz de 31 nm pode-se identificar a larga banda Raman ($932\text{ cm}^{-1} - 990\text{ cm}^{-1}$) referente ao fônon óptico de segunda ordem (2TO) do Si e um pico

em 303 cm^{-1} referente ao fônon acústico (TA – *acoustic phonon*) do Si. As matrizes de nanocilindros de 31 nm e 84 nm apresentaram fracas ou nenhuma linha Raman associada à GSH. No entanto, a Figura 41 mostra que em nanocilindros de 58 nm houve intenso efeito SERS com várias linhas de modos vibracionais da GSH. Estes resultados estão em total concordância com as previsões teóricas da intensificação de campo próximo na região de 785 nm (laser de excitação) para nanocilindros com diâmetro de aproximadamente 60 nm que apresenta campos mais intensos em relação as estruturas de 31 e 84 nm (Fig. 34c). Nesta amostra (58 nm) também foram observadas eventos de flutuação randômica das diferentes linhas Raman da molécula de GSH. De acordo com estes resultados, não apenas o diâmetro e a periodicidade das nanoestruturas induzem o efeito SERS, mas isto sugere que a maior contribuição para este efeito está associada a eventos de formação randômica de picocavidades nas estruturas de nanocilindros. Não foram observadas linhas Raman no filme de referência presente em cada amostra e descrito na Seção 2.1.3, logo, o efeito SERS tornou-se ainda mais evidente.

O espectro SERS da GSH obtido em matriz de nanocilindros de 58 nm revelou intensas linhas Raman (Fig. 41), no qual a mais intensa delas está em 1254 cm^{-1} atribuída à vibração do tipo *wagging* da ligação CH_2 (glutamato). Esta linha aparece com uma intensidade muito pequena no espectro da amostra em pó (Fig. 40b), já a linha em 401 cm^{-1} que aparece mais intensa para a amostra em pó, aparece com intensidade muito fraca no ensaio SERS como pode ser observado na Figura 41. Este comportamento sugere que a ligação CH_2 está sob influência do campo próximo intenso da picocavidade na janela temporal que dura uma varredura da aquisição do espectro. Como veremos mais adiante os eventos de flutuação mudam a posição espectral das linhas mais intensas. Embora a matriz de 58 nm tenha apresentado alta intensificação Raman para a molécula GSH, verificou-se que as linhas flutuavam no tempo, como ocorrera em nanocilindros de 63 nm com a molécula NAD. A intensificação SERS em 1254 cm^{-1} na matriz de 58 nm é cerca de trinta vezes maior que no pó de GSH. Como o efeito SERS da GSH foi mais intenso em nanocilindros de 58 nm, estudou-se o SERS em função do comprimento de onda do laser de excitação para esta amostra (Fig. 42).

Os resultados revelaram que o efeito SERS é mais intenso em laser de 785 nm, além de apresentar mais modos vibracionais. Em 520 cm^{-1} houve saturação do detector para excitação com laser de 785 nm e esta linha foi omitida na Fig. 42. Mas esta linha corresponde ao principal pico de um fônon óptico do Si (substrato) e não traz prejuízo à leitura dos modos da GSH. Não foram observadas linhas Raman em excitação com laser de 532 nm. Devido às flutuações do espectro Raman, nas medidas realizadas em função

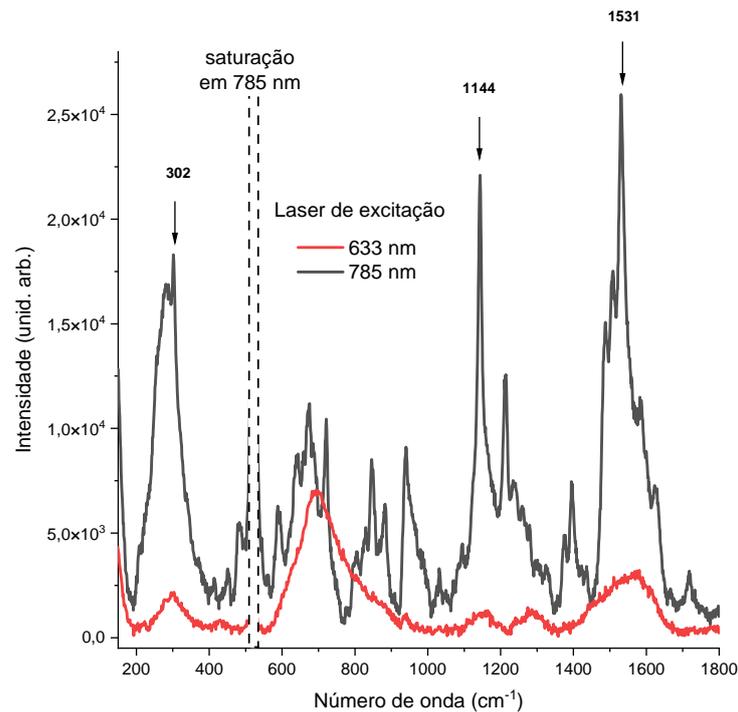


Figura 42 – Espectros SERS de GSH sobre matriz de nanocilindros de 58 nm com laser de excitação de 633 nm e 785 nm.

do laser de excitação, pode-se observar que nos espectros Raman excitados com laser de 785 nm aparecem outros picos intensos diferentes aos observados no espectro da Fig. 41. Dentre as linhas mais intensas neste último espectro, podemos destacar a situada em 1532 cm^{-1} atribuída aos modos de estiramento das ligações N-C e modos de flexão no plano das ligações H-N-C, ambos correspondentes à parte do glutamato. A outra linha intensa está situada em 1144 cm^{-1} e é atribuída aos modos de estiramento do C-C e modo de balanço da ligação C-H₂ do glutamato. Já a outra linha um pouco menos intensa que as anteriores está situada em 302 cm^{-1} (na mesma região do fônon TA do Si) sendo atribuída ao modo de estiramento de C-C-N da glicina.

Como a intensificação SERS é completamente dependente do intenso campo próximo dos plasmons de superfície originados no dispositivo, o resultado do espectro SERS da Figura 42 sugere que a molécula esteja adsorvida de forma estendida sobre a superfície das nanopartículas de Au, já que foram observadas linhas de modos vibracionais correspondentes do glutamato e glicina. No entanto, desde que outros modos vibracionais da molécula de GSH não foram intensificados, só algumas ligações estão sob a influência do campo próximo dos plasmons de superfície. Na Seção 3.3.3, será discutido o elevado efeito SERS e as flutuações das linhas Raman de GSH sobre as matrizes de nanocilindros de 58

nm, sugerindo um possível mecanismo destes efeitos.

3.3.3 As flutuações SERS com a molécula GSH

Quando excitado com laser de 785 nm, o SERS da GSH adsorvida na matriz de nanocilindros de Au de 58 nm revelou elevada intensificação SERS de cerca de trinta vezes para a linha em 1254 cm^{-1} (Fig. 41). Outros exemplos de linhas estão em 896 cm^{-1} intensificada em cerca de três vezes e atribuída à vibração do tipo *stretching* da ligação C-COO⁻ (235); 815 cm^{-1} com aproximadamente o dobro da intensidade do Raman do pó e atribuída à vibração *stretching* da ligação C-CN str. (235); 1177 cm^{-1} atribuída às ligações (O-C) + τ (H-N-C) + γ (C-H) (236, 237); 1520 cm^{-1} atribuída às ligações (N-C) + τ (H-N-C) (238); 862 cm^{-1} atribuída às vibrações *stretching* das ligações C-C do glutamato e da cisteína (207); e em 715 cm^{-1} atribuída à deformação da ligação COO⁻ com intensificação de cerca de nove vezes comparado com o Raman reportado em (207, 235). Assim como em NAD em nanocilindros de 63 nm, em GSH em nanocilindros de 58 nm as linhas Raman são intensas e flutuam ao longo do tempo. Com apenas uma monocamada (ou menos) de moléculas GSH, o padrão das flutuações dependeu da potência do laser de excitação.

O comportamento dinâmico das flutuações foi estudado a partir de espectros Raman obtidos em sequência sob as mesmas condições experimentais, em que T corresponde ao intervalo de tempo entre a leitura atual e a leitura seguinte, este intervalo foi de cerca de 20 segundos. As Figuras 43-45 apresentam espectros obtidos em sequência em potências de excitação de 7 mW, 3,5 mW e 700 μ W, respectivamente. Em todos estes espectros as linhas de base (*background*) já foram subtraídas. Os mapas bidimensionais com diferentes níveis de escala também são mostrados em cada figura, onde o valor mínimo das escalas foi pouco acima do nível de ruído. Assim, as imagens de mapas 2D representam apenas sinais Raman. As atribuições das linhas SERS de GSH observadas nas Figuras 43-45 foram extraídas da Tabela 5 do ApêndiceA.

Nove espectros foram obtidos em sequência em excitação com potência de laser de 7 mW (Fig. 43). O pico do fônon óptico de segunda ordem do Si (2TO) ($932\text{ cm}^{-1} - 990\text{ cm}^{-1}$) foi utilizado como uma referência interna devido a sua persistência. Já o fônon de primeira ordem do Si (520 cm^{-1}) saturou o detector nesta potência de excitação e foi omitido na apresentação dos espectros (linhas tracejadas). Note que a banda com pico em 303 cm^{-1} corresponde ao espalhamento devido ao modo de fônon acústico do substrato de Si. Assim as bandas Raman de 520 cm^{-1} e 303 cm^{-1} aparecem em todos os ensaios

SERS, já que os dispositivos plasmônicos foram fabricados sobre a superfície do substrato de Si.

A linha Raman mais intensa referente à GSH obtida em 7 mW apareceu em 1394 cm^{-1} na varredura iniciada em $t=3T$ com aproximadamente o dobro da intensidade do fônon óptico do Si ($\sim 941\text{ cm}^{-1}$) (Fig. 43). Esta linha é atribuída à vibração em *stretching* simétrico da ligação $-\text{COO}^-$ (235, 239). Embora esta e outras linhas Raman tenham se mostrado intensas, elas flutuaram no tempo. A partir da varredura $t=T$ até a varredura $t=4T$ surgem várias outras linhas mais intensas que a do fônon 2TO do Si correspondentes a outros modos vibracionais da molécula de GSH, sem preservar-se ao longo do tempo, ou seja, elas aparecem e desaparecem sem voltar a aparecer novamente (Figura 43). Surpreendentemente estas linhas apresentam intensidades muito baixas (menores do que a banda 2TO do Si) a partir de $t=5T$, e várias linhas persistentes de baixa intensidade surgem entre $t=5T$ e $t=8T$. Os mapas 2D ilustram estas flutuações das linhas Raman correspondente aos diferentes modos vibracionais da molécula de GSH no tempo e mostram que as únicas linhas persistentes em 7 mW são às correspondentes ao Si em 303 cm^{-1} , 520 cm^{-1} e 941 cm^{-1} (Figs. 43b-43c).

Em potência de excitação de 3,5 mW (Fig. 44) também houve saturação no fônon de primeira ordem do Si (520 cm^{-1}) e é possível identificar o fônon óptico de segunda ordem do Si ($932\text{ cm}^{-1} - 990\text{ cm}^{-1}$) em todas as varreduras, contudo, menos intenso que em 7 mW como esperado. A redução da intensidade da linha Raman do fônon 2TO do Si era esperada com a redução da potência de excitação, entretanto, em 3,5 mW as linhas da GSH tornaram-se mais intensas em relação à banda 2TO do Si. A linha mais intensa nesta figura está em 1526 cm^{-1} para $t=3T$, ela é 3,5 vezes mais intensa que o pico do Si em 941 cm^{-1} e é atribuída às ligações $(\text{N}-\text{C}) + \tau(\text{H}-\text{N}-\text{C})$ (238). Muitas outras linhas estão presentes em uma varredura, mas não em outra, e novas linhas referentes à GSH surgem a cada nova varredura. Este comportamento piscante e randômico com aparecimento de novos modos vibracionais também foi observado nos ensaios SERS para a molécula NAD. Os mapas 2D das Figs. 44b e 44c novamente mostram linhas mais intensas na faixa de 1420 cm^{-1} a 1610 cm^{-1} .

Para a excitação com laser de potência de $700\text{ }\mu\text{W}$ (Fig. 45) o espalhamento promovido pelo Si em $932\text{ cm}^{-1} - 990\text{ cm}^{-1}$ (2TO) já não é evidente em todas as varreduras, todavia, as linhas referentes à GSH continuaram intensas e flutuantes no tempo e em outras frequências de vibração. Note que os picos mais intensos de uma varredura não estão localizados nas mesmas frequências dos picos mais intensos de outra varredura e o perfil do espectro muda constantemente. Algumas varreduras obtiveram linhas atenuadas

e outras linhas intensas, apresentado um padrão randômico entre um e outro espectro Raman. As linhas em 1200 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} referentes à GSH são as mais intensas e presentes na maioria das varreduras. Ainda assim, são fortemente atenuadas ou deslocadas na frequência em ao menos uma varredura. Os mapas 2D (Figs. 45b e 45c) mostram que as linhas de baixa intensidade referentes à GSH flutuaram randômicamente, assim como em 7 mW e 3,5 mW.

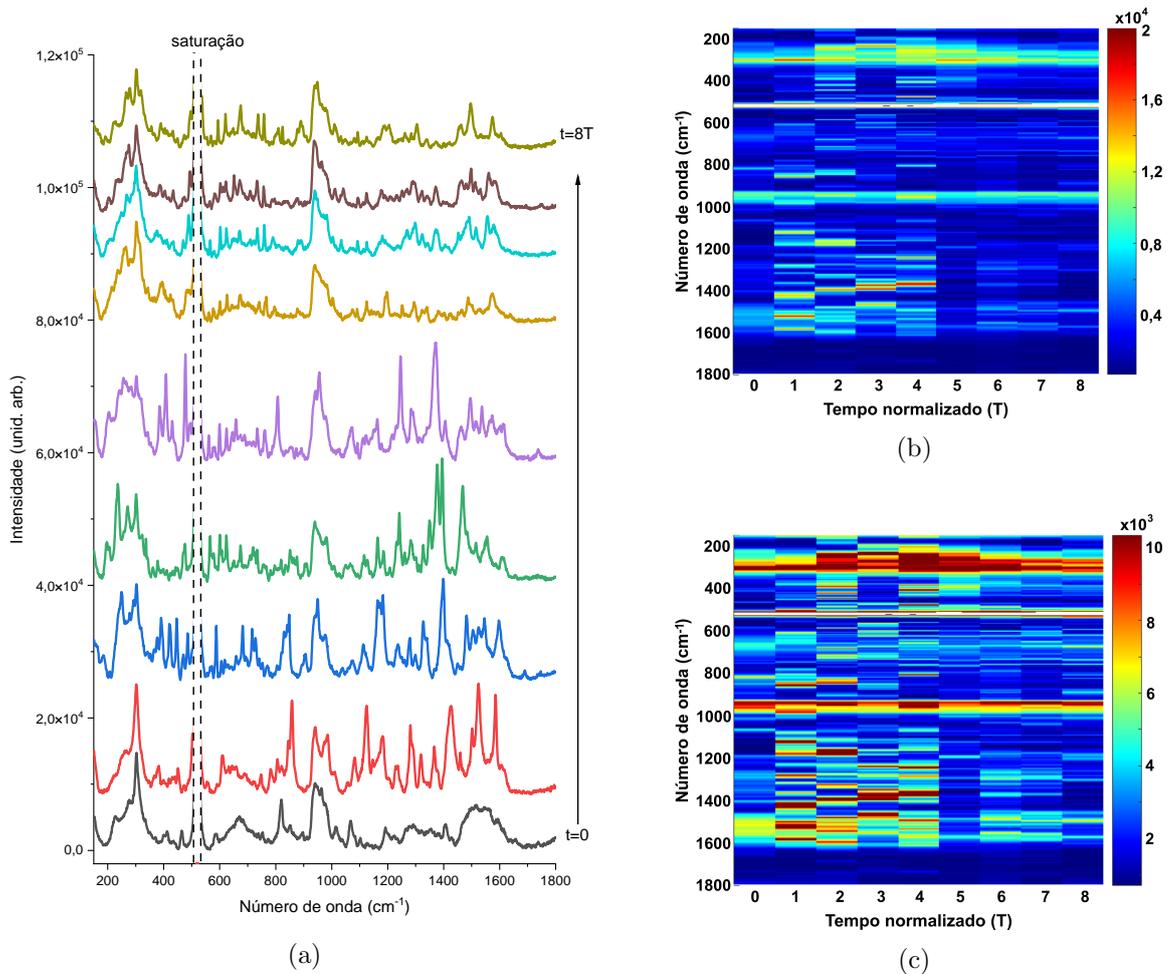


Figura 43 – Espectros SERS de GSH sobre a matriz de nanocilindros de 58 nm excitada por uma fonte laser de 785 nm e 7 mW de potência **(a)**. Mapas 2D de espectros SERS usando a escala do pico mais intenso **(b)** e a metade da escala do pico mais intenso **(c)**.

Assim como na molécula NAD, as flutuações randômicas SERS em GSH também foram quantificadas por meio dos parâmetros de correlação GLCM (172–174). Os métodos, equações e valores de N_g e d aplicados foram os mesmos descritos na Seção 3.2.3. Logo, calculou-se a média GLCM (Eq. 3.1), a variância GLCM (Eq. 3.2) e a correlação GLCM (Eq. 3.3). Diferentemente ao observado nos ensaios SERS da molécula NAD, no caso da GSH os picos correspondentes aos fônons TA, TO e 2TO do substrato do Si apresentaram elevada intensidade. Assim, para evitar interferência destes picos no cálculo da correlação

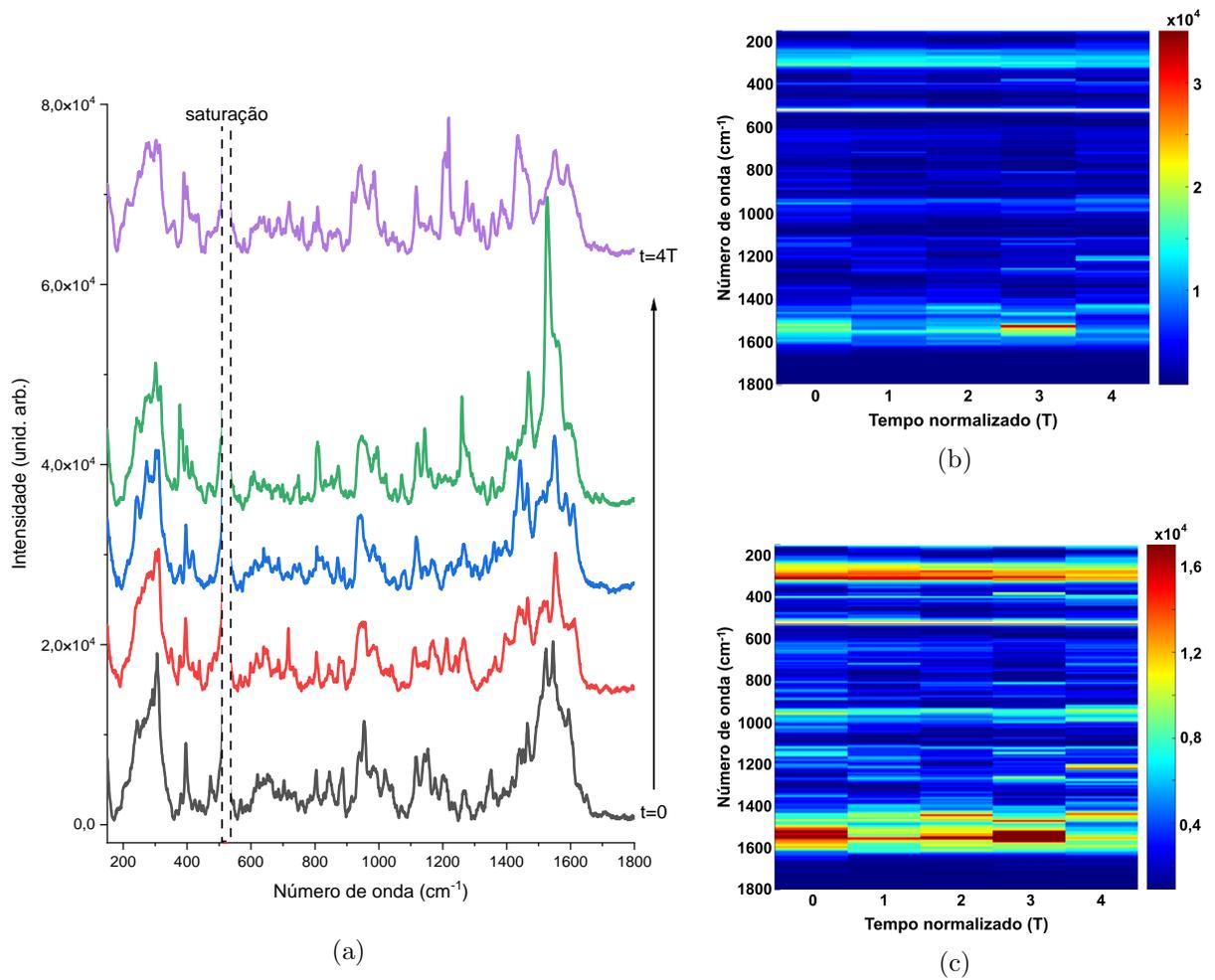


Figura 44 – Espectros SERS de GSH sobre a matriz de nanocilindros de 58 nm excitada por uma fonte laser de 785 nm e 3,5 mW de potência (a). Mapas 2D de espectros SERS usando a escala do pico mais intenso (b) e a metade da escala do pico mais intenso (c).

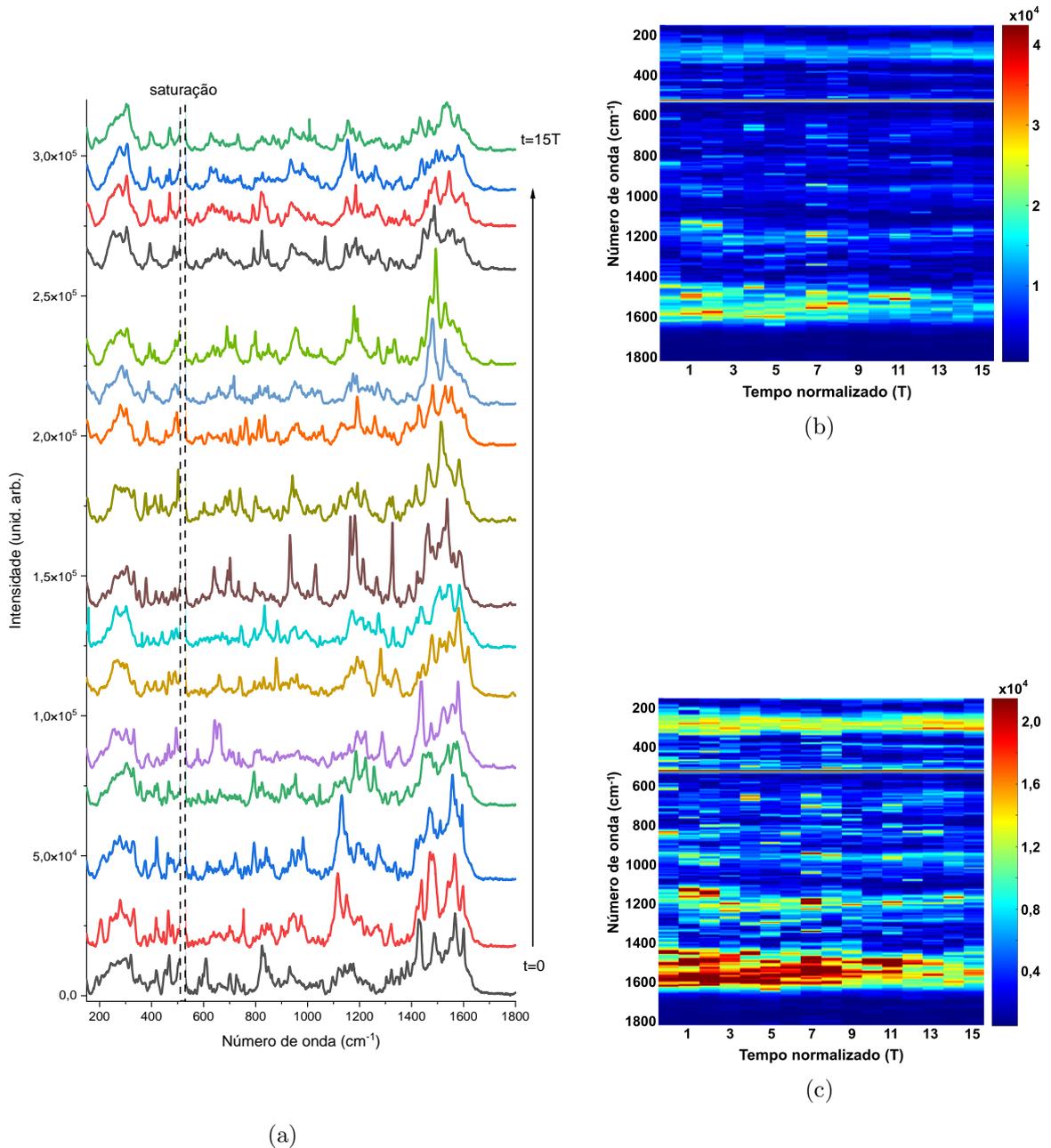


Figura 45 – Espectros SERS de GSH sobre a matriz de nanocilindros de 58 nm excitada por uma fonte laser de 785 nm e 700 μW de potência (a). Mapas 2D de espectros SERS usando a escala do pico mais intenso (b) e a metade da escala do pico mais intenso (c).

em função do tempo e frequência, a faixa espectral de análises de 150 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} foi dividida em 4 faixas: a primeira de 150 cm^{-1} a 280 cm^{-1} , a segunda de 343 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , a terceira faixa de 530 cm^{-1} a 924 cm^{-1} e, a quarta faixa de 999 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} . As Figuras 46a-46d mostram os comportamentos dos coeficientes de correlação em função do tempo correspondentes a cada uma destas faixas, onde T é o tempo necessário para adquirir o espectro de uma varredura Raman entre 150 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} . As Figuras 47a-47d mostram os coeficientes de correlação em função da diferença de número de onda ($\Delta\nu$) para as quatro faixas.

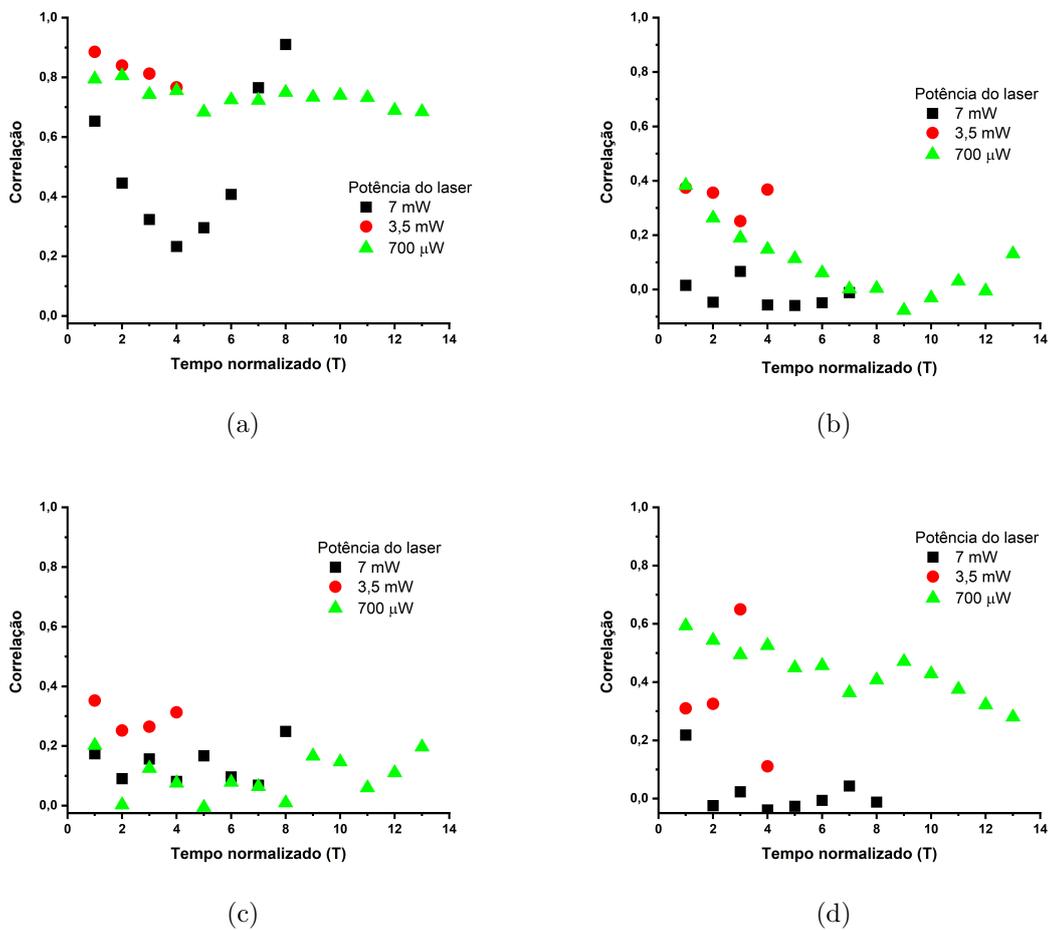


Figura 46 – Coeficiente de correlação GLCM em função de deslocamento no tempo nas regiões espectrais entre 150 cm^{-1} e 280 cm^{-1} (a), entre 343 cm^{-1} e 500 cm^{-1} (b), entre 530 cm^{-1} e 924 cm^{-1} (c) e entre 999 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} (d).

A Figura 46a mostra um valor elevado de correlação (0,8) em função do tempo para as linhas na faixa de 150 cm^{-1} a 280 cm^{-1} . Este comportamento acontece nos espectros obtidos com baixa potência de excitação (3,5 mW e $700\text{ }\mu\text{W}$). Já para uma potência de excitação de 7 mW a correlação flutua entre valores de 0,2 a 0,9, sugerindo que os modos vibracionais nesta faixa espectral apresentam instabilidade SERS quando excitados com laser de elevada potência. As linhas Raman na faixa de 343 cm^{-1} a 500 cm^{-1} (46b)

apresentam valores de coeficientes de correlação menores que 0,4 para todos os espectros obtidos com 7 mW, 3,5 mW e 700 μ W, indicando que os modos vibracionais nesta faixa espectral flutuam randomicamente. Similar comportamento do coeficiente de correlação foi observado para os modos vibracionais na faixa 530 cm^{-1} a 924 cm^{-1} . Na faixa de 999 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} os coeficientes de correlação para os espectros obtidos com laser de 3,5 mW e 700 μ W apresentam valores entre 0,3 e 0,65. Já para os espectros obtidos com excitação de laser de 7 mW os valores de coeficiente de correlação variam de 0,0 a 0,2. Os resultados da Figura 46 mostram o elevado comportamento randômico dos espectros obtidos em diferentes janelas de frequência principalmente para os modos vibracionais da molécula de GSH que estão situadas entre 343 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} .

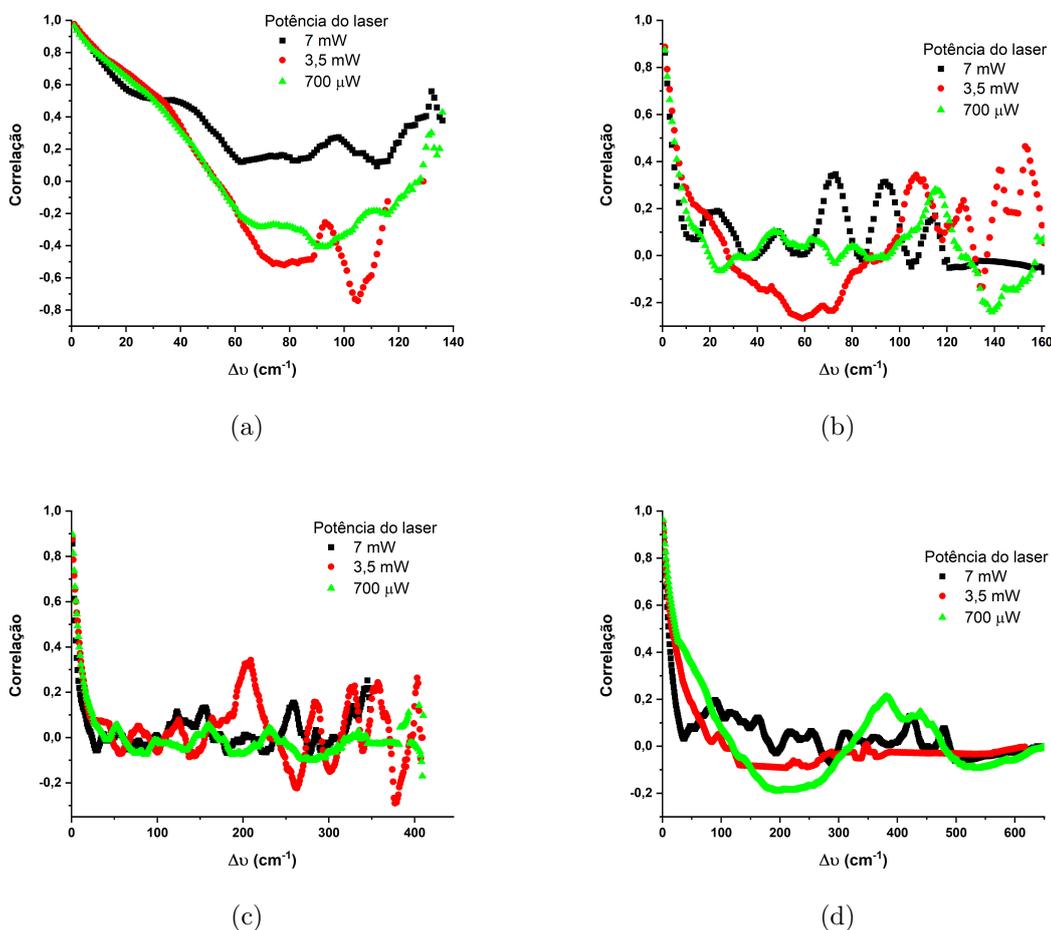


Figura 47 – Coeficiente de correlação GLCM em função do número de onda nas regiões espectrais entre 150 cm^{-1} e 280 cm^{-1} (a), entre 343 cm^{-1} e 500 cm^{-1} (b), entre 530 cm^{-1} e 924 cm^{-1} (c) e entre 999 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} (d).

Os coeficientes de correlação entre as diferentes linhas Raman são mostrados nas Figuras 47a-47d. Em todos os espectros o valor da correlação é próximo de 1 quando o offset em número de onda é igual a zero. Isto era esperado, pois neste caso este valor corresponde à autocorrelação de cada uma das próprias linhas Raman. Na faixa espectral

de 150 cm^{-1} a 280 cm^{-1} (Fig. 47a), a correlação apresenta uma queda do valor 1 para zero de forma lenta. Isto está relacionado à existência de uma banda com largura elevada, como pode ser visto nas Figuras 43a, 44a e 45a. Por outro lado, linhas Raman distantes entre si - acima de 60 cm^{-1} - apresentam baixa correlação quando excitadas com laser de 7 mW . Já as linhas Raman excitadas com potências de $3,5\text{ mW}$ e $700\ \mu\text{W}$ apresentam algum grau de anticorrelação (valor negativo do coeficiente de correlação).

Na faixa espectral de 343 cm^{-1} a 500 cm^{-1} (Fig. 47b), os espectros obtidos com laser de 7 mW de potência apresentam picos de correlação (0,4) nas distâncias de 23, 48, 73, 94, 115 cm^{-1} . Isto mostra que as linhas separadas nos valores acima indicados e suas diferenças entre estas distâncias apresentam correlação média (0,4) para esta potência e nesta região. Os espectros obtidos com potências do laser em $3,5\text{ mW}$ e $700\ \mu\text{W}$ apresentam um padrão menos oscilante nos seus coeficientes de correlação, indicando uma menor correlação entre suas diferentes linhas Raman se comparado com as linhas Raman obtidas com potência laser de 7 mW (Fig. 47a). Na região de 530 cm^{-1} a 924 cm^{-1} (Fig. 47c) as linhas Raman dos espectros obtidos com laser de $3,5\text{ mW}$ apresentam um comportamento oscilante com picos (0,3) em distâncias de 205, 285, 326, 357 cm^{-1} . Já as linhas correspondentes aos espectros obtidos com laser de potência de 7 mW , $3,5\text{ mW}$ e $700\ \mu\text{W}$ apresentam padrões menos oscilante e baixo coeficiente de correlação. Na Região entre 999 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} (Fig. 47d) as correlações entre as diferentes linhas Raman são próximas de zero para os espectros obtidos com as potências de laser de 7 mW e $3,5\text{ mW}$. Mas nesta faixa observa-se uma correlação de 0,3 a 0,6 para $700\ \mu\text{W}$, onde as linhas em torno de 1500 cm^{-1} são intensas nas primeiras varreduras, mas se atenuam nas últimas varreduras (Figs. 45b e 45c). Isto indica uma possível degradação da GSH sobre os nanocilindros por um processo fotocatalítico.

A partir do comportamento dos coeficientes de correlação em função do tempo e da distância entre as linhas (frequência), finalmente podemos afirmar que o comportamento flutuante dos espectros SERS da molécula de GSH é altamente randômico. Tal comportamento é quase independente da potência de excitação do laser, diferentemente do comportamento flutuante dos espectros SERS da molécula NAD. Pois com a NAD foi observada uma dependência do comportamento do coeficiente de correlação em função da potência do laser de excitação, com comportamento mais randômico para laser de baixas potências.

A intensificação Raman da molécula de GSH, também não pode ser explicada apenas pela intensificação dos plasmon de superfície originadas no arranjo periódico dos nanocilindros de Au. Isto porque os cálculos teóricos indicam que nanocilindros de aproximada-

mente 60 nm apresentam uma intensificação de no máximo 8 a 9 vezes, completamente diferente da intensificação observada no presente caso que foi entorno de 4 ordens de grandeza. Assim, como no caso do comportamento SERS da molécula de NAD, podemos atribuir à formação de picocavidades de dimensões atômicas. Esta proposta é sustentada pela tendência mostrada nos cálculos do comportamento de pequenas protuberâncias na superfície dos nanocilindros (Fig. 34) em relação à intensificação do campo próximo. Assim como nos espectros SERS da molécula NAD, podemos atribuir as flutuações à formação e destruição randômica destas picocavidades.

Além da formação e destruição de picocavidades, possíveis deslocamentos mecânicos da molécula de GSH devido à influência dos elevados campos próximos na região das picocavidades também podem contribuir para as flutuações espectrais. As picocavidades, portanto, originam um gradiente de campo elevado induzindo o deslocamento da molécula. Note que para longos períodos de excitação da molécula GSH com laser de 785 nm e potência de 7 mW (utilizado para a obtenção dos espectros SERS), as linhas Raman começam a se atenuar. Este resultado sugere que nestas condições experimentais, em adição a flutuação dos espectros SERS, acontece também uma possível degradação da molécula por efeito fotocatalítico, como sugerido em (90, 104, 240, 241). Isto indicaria que a intensificação de campo próximo originado pelas picocavidades pode intensificar o efeito fotocatalítico para a degradação da molécula de GSH.

Em síntese, o evento de flutuações SERS no tempo e sobre as frequências dos modos vibracionais observado no presente estudo poderia ser devido à geração randômica de picocavidades sobre a superfície do nanocilindro. Os *hot spots* das picocavidades induziram forças gradientes capazes de mudar a configuração da NAD e da GSH sobre as superfícies das picocavidades. Desta forma, as flutuações SERS sobre as frequências dos modos foram promovidas.

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho, matrizes de nanocilindros de Au foram fabricadas por meio de um simples processo utilizando estruturas de alumina com poros organizados como máscara mecânica. As matrizes de nanocilindros se formaram após a deposição de Au pela técnica de *electron beam*. A caracterização por microscopia eletrônica de varredura mostrou uma matriz de padrão hexagonal organizado de nanocilindros. A estrutura em matriz também foi caracterizada por espectroscopia de reflectância. Os espectros de reflectância destas amostras confirmaram a característica periódica dos arranjos de nanocilindros de Au fabricados utilizando as membranas de óxido de alumínio. Por meio desta técnica foram fabricados arranjos de nanocilindros de Au sobre substratos de Si com uma fina camada de SiO₂ (75 nm) e na seção transversal de fibras multimodo. Este último tipo de sistema foi fabricado visando sua utilização em sondas para sensoriamento biomolecular.

As matrizes de nanocilindros de Au de aproximadamente 60 nm de diâmetro mostraram ser a melhor superfície SERS, para as moléculas de NAD e GSH. Estes resultados mostraram-se completamente concordantes com os cálculos teóricos de intensificação de campo próximo obtidos através da técnica FDTD. Os resultados apontam os arranjos de nanocilindros com diâmetro de cerca de 60 nm como os sistemas com maior intensificação de campo próximo se comparados com as outras estruturas fabricadas neste trabalho.

A intensidade SERS extremamente alta de NAD proveniente desta superfície em conjunto com as flutuações ao longo do tempo revelaram um evento SERS correspondente à detecção de uma única molécula. Isto é assumido visto que uma monocamada ou menos de NAD foi depositada sobre a superfície SERS. As flutuações das linhas Raman se revelaram eventos altamente randômicos e não correlacionado ao longo do tempo. Este comportamento randômico foi mais acentuado quando a potência do laser de excitação foi menor do que 700 μ W. Isto foi observado mesmo em potência de excitação laser excepcionalmente baixa (70 nW).

No caso das amostras com GSH, as matrizes de nanocilindros de Au de 58 nm (próximo de 60 nm) de diâmetro mostraram ser a melhor superfície SERS, e flutuações espectrais também foram observadas. Como a preparação da amostra neste caso também garante a adsorção de apenas uma monocamada (ou menos) de GSH, o arranjo experimental indica

a possibilidade de processos de detecção de apenas uma molécula. O comportamento flutuante dos espectros SERS da molécula de GSH mostrou-se altamente randômico, porém, quase independente da potência de excitação do laser. Isto foi diferente das flutuações dos espectros SERS com a molécula NAD, em que foi observada uma dependência do coeficiente de correlação em função da potência do laser de excitação, com comportamento mais randômico para potências baixas do laser.

A alta intensidade SERS e o evento de flutuação com NAD e GSH foram discutidos dentro do acoplamento paramétrico plasmônico-vibracional quântico. Os cálculos FDTD sugerem fortemente que a intensificação SERS na melhor superfície SERS foi promovida pelo mecanismo de ação reversa dinâmica. Neste sentido, a alta intensificação SERS ocorre devido ao acoplamento paramétrico entre a cavidade de plasmon e os modos vibracionais da molécula.

Os resultados experimentais SERS das moléculas NAD e GSH com eventos de flutuações randômicas sugerem que as picocavidades de plasmon se originaram a partir da formação e destruição espontâneas de pequenas protuberâncias (menores do que 2 nm de tamanho) sobre a superfície dos nanocilindros. Estas picocavidades podem induzir a alta intensificação do campo próximo, como verificado pelos cálculos teóricos desenvolvidos. Em adição, a formação e destruição das picocavidades pode promover o evento de flutuação SERS ao longo do tempo, como sugerido em (105). A flutuação sobre as frequências dos modos vibracionais é também relacionada a forças gradientes que podem movimentar a molécula sobre os nanocilindros. Estas forças gradientes também são induzidas pela formação e destruição randômicas de picocavidades, como apontado pelos cálculos teóricos.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como as moléculas NAD e GSH apresentaram maior intensificação SERS em nanoestruturas semelhantes - nanocilindros com aproximadamente 60 nm de diâmetro - espera-se detectar NAD e GSH a partir do mesmo dispositivo. Nestes ensaios futuros, também deseja-se incluir a molécula NADP para se obter informações sobre a redutase e a produção de GSH em sistemas biológicos (Fig. 39). Visto que a GSH é potencial biomarcador de câncer e baixos níveis desta molécula podem causar o estresse oxidativo e o surgimento de doenças, como mal de Parkinson (242, 243).

Apesar da detecção de NAD em matriz de nanocilindros sobre núcleo de fibra óptica ter apresentado potencial na aplicação em dispositivos do tipo sonda, as linhas Raman do núcleo são intensas e podem mascarar as linhas atribuídas à molécula de teste. Para superar este desafio, pretende-se utilizar outra molécula cujos modos vibracionais estejam em uma faixa espectral diferente dos modos do núcleo.

6 ARTIGO PUBLICADO

Segue abaixo o artigo publicado referente a este trabalho. Um outro artigo sobre as flutuações de espectros SERS da glutathione encontra-se em fase final de elaboração.

MAGALHÃES, F. B.; JAIMES, R. F. V. V.; CÓRIO, P.; SALCEDO, W. J. SERS fluctuations of NAD molecules adsorbed on arrays of Au nanocylinders. **Optical Materials Express**, v. 11, n. 9, p. 3154-3177, 2021. DOI: 10.1364/OME.434894.

REFERÊNCIAS

- 1 CHEN, K.; ZHANG, X.; MACFARLANE, D. R. Ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering detection of urea by highly ordered Au/Cu hybrid nanostructure arrays. **Chemical Communications**, Royal Society of Chemistry, v. 53, n. 56, p. 7949–7952, 2017.
- 2 LI, X.-Y. et al. High stability of gold nanoparticles towards DNA modification and efficient hybridization via a surfactant-free peptide route. **Chemical Communications**, Royal Society of Chemistry, v. 53, n. 87, p. 11909–11912, 2017.
- 3 ZHUANG, H. et al. A highly sensitive SERS-based platform for zn (ii) detection in cellular media. **Chemical Communications**, Royal Society of Chemistry, v. 53, n. 11, p. 1797–1800, 2017.
- 4 ITOH, T.; YAMAMOTO, Y. S. Between plasmonics and surface-enhanced resonant Raman spectroscopy: toward single-molecule strong coupling at a hotspot. **Nanoscale**, Royal Society of Chemistry, v. 13, n. 3, p. 1566–1580, 2021.
- 5 ZHANG, Y. et al. Addressing molecular optomechanical effects in nanocavity-enhanced Raman scattering beyond the single plasmonic mode. **Nanoscale**, Royal Society of Chemistry, v. 13, n. 3, p. 1938–1954, 2021.
- 6 LAI, H. et al. Metal–organic frameworks: opportunities and challenges for surface-enhanced Raman scattering—a review. **Journal of Materials Chemistry C**, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 9, p. 2952–2963, 2020.
- 7 MOSIER-BOSS, P. A. Review of SERS substrates for chemical sensing. **Nanomaterials**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 7, n. 6, p. 142, 2017.
- 8 PILOT, R. et al. A review on surface-enhanced Raman scattering. **Biosensors**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 9, n. 2, p. 57, 2019.
- 9 FAN, M.; ANDRADE, G. F.; BROLO, A. G. A review on recent advances in the applications of surface-enhanced Raman scattering in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, Elsevier, v. 1097, p. 1–29, 2020.
- 10 SAHA, A.; JANA, N. R. Detection of cellular glutathione and oxidized glutathione using magnetic–plasmonic nanocomposite-based “turn-off” surface enhanced Raman scattering. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 85, n. 19, p. 9221–9228, 2013.
- 11 KNEIPP, K. et al. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). **Physical Review Letters**, APS, v. 78, n. 9, p. 1667, 1997.
- 12 AROCA, R. F. et al. Silver nanowire layer-by-layer films as substrates for surface-enhanced Raman scattering. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 77, n. 2, p. 378–382, 2005.

- 13 GANDRA, N.; SINGAMANENI, S. Bilayered Raman-intense gold nanostructures with hidden tags (brights) for high-resolution bioimaging. **Advanced Materials**, Wiley Online Library, v. 25, n. 7, p. 1022–1027, 2013.
- 14 ZHANG, J. et al. Quantitative SERS-based DNA detection assisted by magnetic microspheres. **Chemical Communications**, Royal Society of Chemistry, v. 51, n. 83, p. 15284–15286, 2015.
- 15 ZHOU, Y.; DING, R. Quantitative SERS detection of trace glutathione with internal reference embedded Au-core/Ag-shell nanoparticles. **Nano Life**, World Scientific, v. 6, n. 03n04, p. 1642003, 2016.
- 16 YAO, W. et al. One immunoassay probe makes SERS and fluorescence two readout signals: Rapid imaging and determination of intracellular glutathione levels. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Elsevier, v. 223, p. 117303, 2019.
- 17 LAING, S.; GRACIE, K.; FAULDS, K. Multiplex in vitro detection using SERS. **Chemical Society Reviews**, The Royal Society of Chemistry, v. 45, n. 7, p. 1901–1918, 2016.
- 18 SANTOS, J. J. et al. Key role of surface concentration on reproducibility and optimization of SERS sensitivity. **Journal of Raman Spectroscopy**, Wiley Online Library, v. 48, n. 9, p. 1190–1195, 2017.
- 19 VIVONI, A. et al. Determination of the orientation of 6-mercaptapurine adsorbed on a silver electrode by surface-enhanced Raman spectroscopy and normal mode calculations. **Langmuir**, ACS Publications, v. 16, n. 7, p. 3310–3316, 2000.
- 20 FARIA, P. A. et al. A surface-enhanced Raman and ab initio study of spectra of lumazine molecules. **Langmuir**, ACS Publications, v. 16, n. 8, p. 3984–3992, 2000.
- 21 VIJAYAKUMAR, S. C.; VENKATAKRISHNAN, K.; TAN, B. SERS active nanobiosensor functionalized by self-assembled 3D nickel nanonetworks for glutathione detection. **ACS Applied Materials & Interfaces**, ACS Publications, v. 9, n. 6, p. 5077–5091, 2017.
- 22 DENG, D. et al. Facile synthesis of high-quality, water-soluble, near-infrared-emitting PbS quantum dots. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2009, p. 3440–3446, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejic.200900227>.
- 23 XUE, B. et al. Synthesis of NAC capped near infrared-emitting CdTeS alloyed quantum dots and application for in vivo early tumor imaging. **Dalton Transactions**, Royal Society of Chemistry, v. 41, n. 16, p. 4935–4947, 2012.
- 24 CAMPION, A.; KAMBHAMPATI, P. Surface-enhanced Raman scattering. **Chemical Society Reviews**, The Royal Society of Chemistry, v. 27, n. 4, p. 241–250, 1998.
- 25 HAISCH, C. Raman-based microarray readout: a review. **Anal Bioanal Chem**, Springer, v. 408, p. 4534–4545, 2016.

- 26 SCHATZ, G. C.; DUYN, R. P. V. Electromagnetic mechanism of surface-enhanced spectroscopy. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, Wiley: New York, v. 1, p. 759–774, 2002.
- 27 WADELL, C.; SYRENOVA, S.; LANGHAMMER, C. Plasmonic hydrogen sensing with nanostructured metal hydrides. **ACS Nano**, ACS Publications, v. 8, n. 12, p. 11925–11940, 2014.
- 28 FARADAY, M. X. the bakerian lecture.—experimental relations of gold (and other metals) to light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, The Royal Society London, n. 147, p. 145–181, 1857.
- 29 KELLY, K. L. et al. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 107, n. 3, p. 668–677, 2003.
- 30 PEIRIS, S.; MCMURTRIE, J.; ZHU, H.-Y. Metal nanoparticle photocatalysts: emerging processes for green organic synthesis. **Catalysis Science & Technology**, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 2, p. 320–338, 2016.
- 31 KREIBIG, U.; VOLLMER, M. **Optical properties of metal clusters**. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2013. v. 25.
- 32 MAIER, S. A. **Plasmonics: Fundamentals and Applications**. [S.l.]: Springer, 2007. ISBN 978-0-387-37825-1.
- 33 MAO, Z. et al. Metal–semiconductor contacts induce the charge-transfer mechanism of surface-enhanced Raman scattering. **The Journal of Physical Chemistry C**, ACS Publications, v. 115, n. 37, p. 18378–18383, 2011.
- 34 LOMBARDI, R. L. B. J. R. Theory of surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Chemical Physics**, v. 136, n. 14, p. 144704, 2012.
- 35 KANG, Z. et al. Enhanced photoelectrochemical property of ZnO nanorods array synthesized on reduced graphene oxide for self-powered biosensing application. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 64, p. 499–504, 2015.
- 36 MAZNICHENKO, D.; VENKATAKRISHNAN, K.; TAN, B. Stimulating multiple SERS mechanisms by a nanofibrous three-dimensional network structure of titanium dioxide (TiO₂). **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 1, p. 578–583, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp310193a>>.
- 37 LI, W. et al. Cute nanocrystals: Shape and size control, plasmonic properties, and use as SERS probes and photothermal agents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 19, p. 7098–7101, 2013. PMID: 23647089. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja401428e>>.
- 38 FAN, J. A. et al. Self-assembled plasmonic nanoparticle clusters. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 328, n. 5982, p. 1135–1138, 2010.
- 39 YANAI, A. et al. Near-and far-field properties of plasmonic oligomers under radially and azimuthally polarized light excitation. **ACS Nano**, ACS Publications, v. 8, n. 5, p. 4969–4974, 2014.

- 40 DICKREUTER, S.; KERN, D. P.; FLEISCHER, M. Single particle dark-field spectroscopy of spherical dimers with down to sub-10 nm gaps fabricated by the annealing of nano-pillars. **Nanophotonics**, v. 7, n. 7, p. 1317–1324, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/nanoph-2018-0016>.
- 41 AVERITT, R.; SARKAR, D.; HALAS, N. Plasmon resonance shifts of Au-coated Au 2 s nanoshells: insight into multicomponent nanoparticle growth. **Physical Review Letters**, APS, v. 78, n. 22, p. 4217, 1997.
- 42 JAIN, P. K.; EL-SAYED, M. A. Universal scaling of plasmon coupling in metal nanostructures: extension from particle pairs to nanoshells. **Nano Letters**, ACS Publications, v. 7, n. 9, p. 2854–2858, 2007.
- 43 HUANG, L. et al. Plasmonic silver nanoshells for drug and metabolite detection. **Nature Communications**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2017.
- 44 LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 103, n. 40, p. 8410–8426, 1999.
- 45 JIN, R. et al. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 294, n. 5548, p. 1901–1903, 2001.
- 46 MAHMOUD, M. A. Plasmon resonance hybridization of gold nanospheres and palladium nanoshells combined in a rattle structure. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, ACS Publications, v. 5, n. 15, p. 2594–2600, 2014.
- 47 AIZPURUA, J. et al. Optical properties of gold nanorings. **Physical Review Letters**, APS, v. 90, n. 5, p. 057401, 2003.
- 48 JIANG, H.; SABARINATHAN, J. Near infrared surface plasmon resonance of gold nanoring based plasmonic crystals for sensor applications. In: IEEE. CONFERENCE ON NANOTECHNOLOGY (IEEE-NANO),9. **Proceedings**. [S.l.], IEEE, 2009. p. 777–780.
- 49 AIZPURUA, J. et al. Optical properties of coupled metallic nanorods for field-enhanced spectroscopy. **Physical Review B**, APS, v. 71, n. 23, p. 235420, 2005.
- 50 FUNSTON, A. M. et al. Plasmon coupling of gold nanorods at short distances and in different geometries. **Nano Letters**, ACS Publications, v. 9, n. 4, p. 1651–1658, 2009.
- 51 HAO, F. et al. Plasmon resonances of a gold nanostar. **Nano Letters**, ACS Publications, v. 7, n. 3, p. 729–732, 2007.
- 52 NOVIKOV, S. M. et al. Gold spiky nanodumbbells: Anisotropy in gold nanostars. **Particle & Particle Systems Characterization**, Wiley Online Library, v. 31, n. 1, p. 77–80, 2014.
- 53 KIM, C. et al. In vivo photoacoustic mapping of lymphatic systems with plasmon-resonant nanostars. **Journal of Materials Chemistry**, Royal Society of Chemistry, v. 21, n. 9, p. 2841–2844, 2011.

- 54 SU, K.-H. et al. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. **Nano Letters**, ACS Publications, v. 3, n. 8, p. 1087–1090, 2003.
- 55 RECHBERGER, W. et al. Optical properties of two interacting gold nanoparticles. **Optics Communications**, Elsevier, v. 220, n. 1-3, p. 137–141, 2003.
- 56 XIU, X. et al. Manipulating the surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) activity and plasmon-driven catalytic efficiency by the control of Ag NP/graphene layers under optical excitation. **Nanophotonics**, De Gruyter, v. 10, n. 5, p. 1529–1540, 2021.
- 57 LI, C. et al. Local hot charge density regulation: Vibration-free pyroelectric nanogenerator for effectively enhancing catalysis and in-situ surface enhanced Raman scattering monitoring. **Nano Energy**, Elsevier, v. 81, p. 105585, 2021.
- 58 LIU, N. et al. Nanoantenna-enhanced gas sensing in a single tailored nanofocus. **Nature Materials**, Nature Publishing Group, v. 10, n. 8, p. 631–636, 2011.
- 59 LARSSON, E. M. et al. Sensing characteristics of NIR localized surface plasmon resonances in gold nanorings for application as ultrasensitive biosensors. **Nano Letters**, ACS Publications, v. 7, n. 5, p. 1256–1263, 2007.
- 60 BERNARDO, I. D. et al. Self-assembly of noble metal-free graphene–copper plasmonic metasurfaces. **Journal of Materials Chemistry C**, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 34, p. 11896–11905, 2020.
- 61 LI, X. et al. Self-assembled monolayer film of concave star-shaped Au nanocrystals as highly efficient SERS substrates. **Applied Surface Science**, Elsevier, v. 518, p. 146217, 2020.
- 62 SUN, J. et al. Uniform and reproducible plasmon-enhanced fluorescence substrate based on PMMA-coated, large-area Au@ Ag nanorod arrays. **Nano Research**, Springer, v. 11, n. 2, p. 953–965, 2018.
- 63 LIU, D. et al. Air-liquid interfacial self-assembly of two-dimensional periodic nanostructured arrays. **ChemNanoMat**, Wiley Online Library, v. 5, n. 11, p. 1338–1360, 2019.
- 64 SLISTAN-GRIJALVA, A. et al. Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, Elsevier, v. 27, n. 1-2, p. 104–112, 2005.
- 65 LIN, K.-Q. et al. Plasmonic photoluminescence for recovering native chemical information from surface-enhanced Raman scattering. **Nature Communications**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2017.
- 66 LI, C. et al. LSPR sensing of molecular biothiols based on noncoupled gold nanorods. **Langmuir**, ACS Publications, v. 26, n. 11, p. 9130–9135, 2010.
- 67 KELLER, F.; HUNTER, M.; ROBINSON, D. Structural features of oxide coatings on aluminum. **Journal of the Electrochemical Society**, IOP Publishing, v. 100, n. 9, p. 411, 1953.

- 68 MASUDA, H.; YASUI, K.; NISHIO, K. Fabrication of ordered arrays of multiple nanodots using anodic porous alumina as an evaporation mask. **Advanced Materials**, Wiley Online Library, v. 12, n. 14, p. 1031–1033, 2000.
- 69 DIGGLE, J. W.; DOWNIE, T. C.; GOULDING, C. Anodic oxide films on aluminum. **Chemical Reviews**, ACS Publications, v. 69, n. 3, p. 365–405, 1969.
- 70 HAO, Q. et al. Controlled patterning of plasmonic dimers by using an ultrathin nanoporous alumina membrane as a shadow mask. **ACS Applied Materials & Interfaces**, ACS Publications, v. 9, n. 41, p. 36199–36205, 2017.
- 71 HUANG, Z. et al. Large-area Ag nanorod array substrates for SERS: AAO template-assisted fabrication, functionalization, and application in detection PCBs. **Journal of Raman Spectroscopy**, Wiley Online Library, v. 44, n. 2, p. 240–246, 2013.
- 72 MASUDA, H.; FUKUDA, K. Fabrication of highly ordered structures using anodic porous alumina. **Science**, v. 268, n. 5216, p. 1466–1468, 1995.
- 73 HAO, Q. et al. Facile design of ultra-thin anodic aluminum oxide membranes for the fabrication of plasmonic nanoarrays. **Nanotechnology**, IOP Publishing, v. 28, n. 10, p. 105301, 2017.
- 74 LEE, W. et al. Wafer-scale Ni imprint stamps for porous alumina membranes based on interference lithography. **Small**, Wiley Online Library, v. 2, n. 8-9, p. 978–982, 2006.
- 75 WEN, L. et al. Cost-effective atomic layer deposition synthesis of Pt nanotube arrays: Application for high performance supercapacitor. **Small**, Wiley Online Library, v. 10, n. 15, p. 3162–3168, 2014.
- 76 WANG, C. et al. Growth control of AgTCNQ nanowire arrays by using a template-assisted electro-deposition method. **Journal of Materials Chemistry C**, Royal Society of Chemistry, v. 1, n. 48, p. 8003–8006, 2013.
- 77 WANG, Z. et al. Manipulation of charge transfer and transport in plasmonic-ferroelectric hybrids for photoelectrochemical applications. **Nature Communications**, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2016.
- 78 WEN, L. et al. Multiple nanostructures based on anodized aluminium oxide templates. **Nature Nanotechnology**, Nature Publishing Group, v. 12, n. 3, p. 244–250, 2017.
- 79 HAO, Q. et al. Controlled patterning of plasmonic dimers by using an ultrathin nanoporous alumina membrane as a shadow mask. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 41, p. 36199–36205, 2017. PMID: 28948758. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsami.7b11428>.
- 80 WU, J. et al. Preparation and SERS properties of petaloid Ag nanostructures induced by regular spontaneous stress distribution. **Vacuum**, Elsevier, v. 172, p. 109106, 2020.
- 81 DAN, Y. et al. Highly ordered Au-decorated Ag nanorod arrays as an ultrasensitive and reusable substrate for surface enhanced Raman scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Elsevier, v. 560, p. 360–365, 2019.

- 82 PARK, W.-H.; AHN, S.-H.; KIM, Z. H. Surface-enhanced Raman scattering from a single nanoparticle–plane junction. **ChemPhysChem**, Wiley Online Library, v. 9, n. 17, p. 2491–2494, 2008.
- 83 RODRIGUEZ-LORENZO, L. et al. Surface enhanced Raman scattering using star-shaped gold colloidal nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, ACS Publications, v. 114, n. 16, p. 7336–7340, 2010.
- 84 SONNTAG, M. D. et al. Recent advances in Tip-enhanced Raman spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, ACS Publications, v. 5, n. 18, p. 3125–3130, 2014.
- 85 LOMBARDI, A. et al. Anomalous spectral shift of near-and far-field plasmonic resonances in nanogaps. **ACS Photonics**, ACS Publications, v. 3, n. 3, p. 471–477, 2016.
- 86 FISK, H. et al. Achieving optimal SERS through enhanced experimental design. **Journal of Raman Spectroscopy**, Wiley Online Library, v. 47, n. 1, p. 59–66, 2016.
- 87 ETCHEGOIN, P. G.; MEYER, M.; RU, E. L. Statistics of single molecule SERS signals: is there a poisson distribution of intensities? **Physical Chemistry Chemical Physics**, Royal Society of Chemistry, v. 9, n. 23, p. 3006–3010, 2007.
- 88 BRULE, T. et al. Statistical and fourier analysis for in-line concentration sensitivity in single molecule dynamic-SERS. **ACS Photonics**, ACS Publications, v. 2, n. 9, p. 1266–1271, 2015.
- 89 GRYS, D.-B. et al. Eliminating irreproducibility in SERS substrates. **Journal of Raman Spectroscopy**, Wiley Online Library, v. 52, n. 2, p. 412–419, 2021.
- 90 ZONG, C. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges. **Chemical Reviews**, ACS Publications, v. 118, n. 10, p. 4946–4980, 2018.
- 91 SAHA, A.; PALMAL, S.; JANA, N. R. Highly reproducible and sensitive surface-enhanced Raman scattering from colloidal plasmonic nanoparticle via stabilization of hot spots in graphene oxide liquid crystal. **Nanoscale**, Royal Society of Chemistry, v. 4, n. 20, p. 6649–6657, 2012.
- 92 GAO, J. et al. An intrinsic internal standard substrate of Au@ PS-b-P4VP for rapid quantification by surface enhanced Raman scattering. **Analyst**, Royal Society of Chemistry, v. 142, n. 16, p. 2936–2944, 2017.
- 93 SHI, C.-X. et al. Quantification of dopamine in biological samples by surface-enhanced Raman spectroscopy: Comparison of different calibration models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Elsevier, v. 169, p. 87–93, 2017.
- 94 SUBAIHI, A. et al. Towards improved quantitative analysis using surface-enhanced Raman scattering incorporating internal isotope labelling. **Analytical Methods**, Royal Society of Chemistry, v. 9, n. 47, p. 6636–6644, 2017.

- 95 SANCHEZ-ILLANA, A. et al. On-capillary surface-enhanced Raman spectroscopy: Determination of glutathione in whole blood microsamples. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 15, p. 9093–9100, 2018. PMID: 29939015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01492>.
- 96 ZHANG, D. et al. Isotope edited internal standard method for quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 3563–3569, 2005. PMID: 15924390. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac050338h>.
- 97 STREHLE, K. R. et al. A reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy approach. online SERS measurements in a segmented microfluidic system. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 79, n. 4, p. 1542–1547, 2007.
- 98 BARBRY, M. et al. Atomistic near-field nanoplasmonics: reaching atomic-scale resolution in nanooptics. **Nano Letters**, ACS Publications, v. 15, n. 5, p. 3410–3419, 2015.
- 99 ITOH, T.; YAMAMOTO, Y. S. Recent topics on single-molecule fluctuation analysis using blinking in surface-enhanced resonance Raman scattering: clarification by the electromagnetic mechanism. **Analyst**, Royal Society of Chemistry, v. 141, n. 17, p. 5000–5009, 2016.
- 100 LIN, K.-Q. et al. Size effect on SERS of gold nanorods demonstrated via single nanoparticle spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 37, p. 20806–20813, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b02098>.
- 101 WU, D.-Y. et al. Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy of nanostructures. **Chemical Society Reviews**, The Royal Society of Chemistry, v. 37, p. 1025–1041, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/B707872M>.
- 102 SIIMAN, O.; RIVELLINI, R.; PATEL, R. Orientation and conformation of NAD and NADH adsorbed on colloidal silver. **Inorganic Chemistry**, v. 27, p. 3940–3949, 1988. ISSN 1520510X.
- 103 SMITH, P. E.; TANNER, J. J. Conformations of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in various environments. **Journal of Molecular Recognition**, v. 13, n. 1, p. 27–34, 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291099-1352%28200001/02%2913%3A1%3C27%3A%3AAID-JMR483%3E3.0.CO%3B2-8>.
- 104 MATIKAINEN, A. et al. Atmospheric oxidation and carbon contamination of silver and its effect on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2016.
- 105 CARNEGIE, C. et al. Room-temperature optical picocavities below 1 nm³ accessing single-atom geometries. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 9, n. 24, p. 7146–7151, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.8b03466>.
- 106 XIAO, Y.-J.; CHEN, Y.-F.; GAO, X.-X. Comparative study of the surface enhanced near infrared Raman spectra of adenine and NAD⁺ on a gold electrode. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Elsevier, v. 55, n. 6, p. 1209–1218, 1999.

- 107 YANG, H. et al. In situ Raman spectra of an NAD⁺-modified silver electrode at various potentials. **Journal of Raman Spectroscopy**, Wiley Online Library, v. 35, n. 3, p. 190–194, 2004.
- 108 YANG, H. et al. Self-assembled monolayer of NAD at silver surface: a Raman mapping study. **Surface Science**, Elsevier, v. 551, n. 1-2, p. 1–8, 2004.
- 109 SINGH, G. et al. Structure and vibrations of glutathione studied by vibrational spectroscopy and density functional theory. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Elsevier, v. 149, p. 505–515, 2015.
- 110 YAN, H. et al. A fast response hydrogen sensor with Pd metallic grating onto a fiber's end-face. **Optics Communications**, v. 359, p. 157–161, 2016. ISSN 0030-4018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030401815301218>.
- 111 WOLF, H. F. **Silicon semiconductor data**. [S.l.]: Pergamon, 1969. v. 9.
- 112 HAO, Q. et al. Facile design of ultra-thin anodic aluminum oxide membranes for the fabrication of plasmonic nanoarrays. **Nanotechnology**, IOP Publishing, v. 28, n. 10, p. 105301, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa596d>.
- 113 PAZOS-PEREZ, N. et al. From nano to micro: synthesis and optical properties of homogeneous spheroidal gold particles and their superlattices. **Langmuir**, ACS Publications, v. 28, n. 24, p. 8909–8914, 2012.
- 114 JR, M. A. M. et al. Preparacao de nanoparticulas de prata e ouro: um metodo simples para a introducao da nanociencia em laboratorio de ensino. **Quimica Nova**, SciELO Brasil, v. 35, p. 1872–1878, 2012.
- 115 JAIMES, R. F. V. V. et al. Espalhamento Raman intensificado por nanoestruturas de ouro na presença da coenzima dinucleotídeo de nicotinamida e adenina. In: Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 38. **Proceedings**. [S.l.: s.n.], 2015.
- 116 HE, S. et al. Baseline correction for Raman spectra using an improved asymmetric least squares method. **Anal. Methods**, The Royal Society of Chemistry, v. 6, p. 4402–4407, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C4AY00068D>.
- 117 EILERS, P. H. C. A perfect smoother. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 14, p. 3631–3636, 2003. PMID: 14570219. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac034173t>.
- 118 HARDEN, A.; YOUNG, W. J. The alcoholic ferment of yeast-juice. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, The Royal Society London, v. 77, n. 519, p. 405–420, 1906.
- 119 UENO, N. Tuning organic band structures with coulomb interactions: The smooth change of band gaps in blends of organic semiconductors arises from long-range electronic interactions. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 352, p. 1395–1396, 6 2016. ISSN 10959203.
- 120 MOLANO-AREVALO, J. C. et al. Insights from ion mobility-mass spectrometry, infrared spectroscopy, and molecular dynamics simulations on nicotinamide adenine dinucleotide structural dynamics: NAD⁺ vs. NADH. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Royal Society of Chemistry, v. 20, p. 7043–7052, 2018. ISSN 14639076.

- 121 MACDONALD, M. J.; MARSHALL, L. K. Mouse lacking NAD⁺-linked glycerol phosphate dehydrogenase has normal pancreatic beta cell function but abnormal metabolite pattern in skeletal muscle. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Elsevier, v. 384, n. 1, p. 143–153, 2000.
- 122 SANNI, L. A. et al. Is ischemia involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? **The American Journal of Pathology**, Elsevier, v. 159, n. 3, p. 1105–1112, 2001.
- 123 MONGAN, P. D. et al. Pyruvate improves redox status and decreases indicators of hepatic apoptosis during hemorrhagic shock in swine. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, American Physiological Society Bethesda, MD, 2002.
- 124 GAIKWAD, A. et al. In vivo role of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the regulation of intracellular redox state and accumulation of abdominal adipose tissue. **Journal of Biological Chemistry**, Elsevier, v. 276, n. 25, p. 22559–22564, 2001.
- 125 BELENKY, P.; BOGAN, K. L.; BRENNER, C. NAD⁺ metabolism in health and disease. **Trends in Biochemical Sciences**, Elsevier, v. 32, n. 1, p. 12–19, 2007.
- 126 SCHREIBER, V. et al. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. **Nature Reviews Molecular Cell biology**, Nature Publishing Group, v. 7, n. 7, p. 517–528, 2006.
- 127 ANDERSON, R. M. et al. Manipulation of a nuclear NAD⁺ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ levels. **Journal of Biological Chemistry**, Elsevier, v. 277, n. 21, p. 18881–18890, 2002.
- 128 KATOH, A.; HASHIMOTO, T. Molecular biology of pyridine nucleotide and nicotine biosynthesis. **Front Biosci**, v. 9, p. 1577–1586, 2004.
- 129 POLLAK, N.; DÖLLE, C.; ZIEGLER, M. The power to reduce: pyridine nucleotides—small molecules with a multitude of functions. **Biochemical Journal**, Portland Press, v. 402, n. 2, p. 205–218, 2007.
- 130 GUSE, A. H. Calcium mobilizing second messengers derived from NAD. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, Elsevier, v. 1854, n. 9, p. 1132–1137, 2015.
- 131 LEE, H. C. Cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NADP) as messengers for calcium mobilization. **Journal of Biological Chemistry**, Elsevier, v. 287, n. 38, p. 31633–31640, 2012.
- 132 AREDIA, F.; SCOVASSI, A. I. Poly (ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death. **Biochemical Pharmacology**, Elsevier, v. 92, n. 1, p. 157–163, 2014.
- 133 ROSADO, M. M. et al. Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings. **Immunology**, Wiley Online Library, v. 139, n. 4, p. 428–437, 2013.

- 134 DURNIN, L. et al. Release, neuronal effects and removal of extracellular β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD⁺) in the rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 35, p. 423–435, 2 2012. ISSN 0953816X.
- 135 PANKIEWICZ, K. W. et al. Send orders for reprints to reprints@benthamscience.ae nicotinamide adenine dinucleotide based therapeutics, update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 3991–4028, 2015.
- 136 PEEK, C. B. et al. Circadian clock NAD cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. **Science**, v. 342, n. 6158, p. 1243417, 2013. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1243417>.
- 137 YANG, H. et al. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. **Cell**, Elsevier B.V., v. 130, p. 1095–1107, 9 2007. ISSN 00928674.
- 138 DILLIN, A. et al. Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria. **eLife**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.33246.001>.
- 139 DÖLLE, C.; RACK, J. G.; ZIEGLER, M. NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria. **FEBS Journal**, v. 280, p. 3530–3541, 8 2013. ISSN 1742464X.
- 140 WOŹNIACKA, A. et al. Topical application of NADH for the treatment of rosacea and contact dermatitis. **Clinical and Experimental Dermatology: Clinicopathological Cases**, Wiley Online Library, v. 28, n. 1, p. 61–63, 2003.
- 141 BRAIDY, N.; GRANT, R.; SACHDEV, P. S. Nicotinamide adenine dinucleotide and its related precursors for the treatment of Alzheimer's disease. **Current Opinion in Psychiatry**, Wolters Kluwer, v. 31, n. 2, p. 160–166, 2018.
- 142 GIANGRECO, I.; PACKER, M. J. Pharmacophore binding motifs for nicotinamide adenine dinucleotide analogues across multiple protein families: A detailed contact-based analysis of the interaction between proteins and NAD(P) cofactors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6175–6189, 2013. PMID: 23889609. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm400644z>.
- 143 LIN, S.-J.; GUARENTE, L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 241–246, 2003. ISSN 0955-0674. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067403000061>.
- 144 ROSSMANN, M. G. Molecular structure of NAD. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 262, n. 5570, p. 726–726, 1976.
- 145 OTAGIRI, M. et al. Crystal structure of meso-2, 3-butanediol dehydrogenase in a complex with NAD⁺ and inhibitor mercaptoethanol at 1.7 Å resolution for understanding of chiral substrate recognition mechanisms. **The Journal of Biochemistry**, Oxford University Press, v. 129, n. 2, p. 205–208, 2001.
- 146 CHEN, S. P. et al. SERS investigation of NAD⁺ adsorbed on a silver electrode. **Langmuir**, v. 18, p. 9888–9900, 12 2002. ISSN 07437463.

- 147 MCDONALD, G. et al. Effects of environment on the folding of nicotinamide-adenine dinucleotides in aqueous solutions. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 11, n. 10, p. 1920–1930, 1972.
- 148 RIDDLE, R. M. et al. Nuclear magnetic resonance studies on pyridine dinucleotides. 6. dependence of the carbon-13 spin-lattice relaxation time of 1-methylnicotinamide and nicotinamide adenine dinucleotide as a function of pD and phosphate concentration. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 98, n. 14, p. 4286–4290, 1976.
- 149 ZENS, A. P. et al. Nuclear magnetic resonance studies on pyridine dinucleotides. 7. the solution conformational dynamics of the adenosine portion of nicotinamide adenine dinucleotide and other related purine containing compounds. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 98, n. 24, p. 7559–7564, 1976.
- 150 ZENS, A. et al. Nuclear magnetic resonance studies on pyridine dinucleotides. ii. solution conformational dynamics of nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide mononucleotide as viewed by proton T1 measurements. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 97, n. 10, p. 2850–2857, 1975.
- 151 TANNER, J. J. et al. Unusual folded conformation of nicotinamide adenine dinucleotide bound to flavin reductase P. **Protein Science**, v. 8, n. 9, p. 1725–1732, 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1110/ps.8.9.1725>.
- 152 SIMPSON, N. et al. Infrared spectroscopy of nicotinamide adenine dinucleotides in one and two dimensions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, p. 16468–16478, 12 2013. ISSN 15206106.
- 153 KORETSKY, A. P.; KATZ, L. A.; BALABAN, R. S. Determination of pyridine nucleotide fluorescence from the perfused heart using an internal standard. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, American Physiological Society Bethesda, MD, v. 253, n. 4, p. H856–H862, 1987.
- 154 CHANCE, B.; LIEBERMAN, M. Intrinsic fluorescence emission from the cornea at low temperatures: evidence of mitochondrial signals and their differing redox states in epithelial and endothelial sides. **Experimental Eye Research**, Elsevier, v. 26, n. 1, p. 111–117, 1978.
- 155 JAMESON, D. M.; THOMAS, V.; ZHOU, D. Time-resolved fluorescence studies on NADH bound to mitochondrial malate dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 994, n. 2, p. 187–190, 1989. ISSN 0167-4838. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167483889901593>.
- 156 GUSSONI, M.; RUI, M.; ZERBI, G. Electronic and relaxation contribution to linear molecular polarizability. an analysis of the experimental values. **Journal of Molecular Structure**, Elsevier, v. 447, n. 3, p. 163–215, 1998.
- 157 SCHENK, E. R. et al. Kinetic intermediates of holo- and apo-myoglobin studied using hdx-tims-ms and molecular dynamic simulations. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 26, n. 4, p. 555–563, 2015. PMID: 25690175. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1067-9>.

- 158 SCHENK, E. R. et al. Isomerization kinetics of at hook decapeptide solution structures. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 1210–1214, 2014. PMID: 24364733. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac403386q>.
- 159 SCHENK, E. R. et al. Direct observation of differences of carotenoid polyene chain cis/trans isomers resulting from structural topology. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 4, p. 2019–2024, 2014. PMID: 24428664. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac403153m>.
- 160 WARREN, S. C.; THIMSEN, E. Plasmonic solar water splitting. **Energy Environmental Science**, The Royal Society of Chemistry, v. 5, p. 5133–5146, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C1EE02875H>.
- 161 CLAVERO, C. Plasmon-induced hot-electron generation at nanoparticle/metal-oxide interfaces for photovoltaic and photocatalytic devices. **Nature Photonics**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 2, p. 95–103, 2014.
- 162 SANCHEZ-IGLESIAS, A.; CHUVILIN, A.; GRZELCZAK, M. Plasmon-driven photoregeneration of cofactor molecules. **Chemical Communications**, The Royal Society of Chemistry, v. 51, p. 5330–5333, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C4CC07829B>.
- 163 JAYABAL, S.; RAMARAJ, R. Amperometric sensing of NADH at gold nanorods stabilized in amine-functionalized silicate sol-gel matrix modified electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, Springer, v. 45, n. 8, p. 881–888, 2015.
- 164 XIAO, Y.-J.; MARKWELL, J. Potential dependence of the conformations of nicotinamide adenine dinucleotide on gold electrode determined by FT-Near-IR-SERS. **Langmuir**, ACS Publications, v. 13, n. 26, p. 7068–7074, 1997.
- 165 XIAO, Y. J. et al. Effects of glutamate dehydrogenase enzyme on the SERS spectra of nicotinamide adenine dinucleotide on a gold electrode. **Langmuir**, American Chemical Society, v. 14, p. 7420–7426, 12 1998. ISSN 07437463.
- 166 YUE, K. T. et al. Raman spectroscopy of oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotides. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 25, n. 17, p. 4941–4947, 1986.
- 167 RAMALINGAM, S. et al. FT-IR and FT-Raman vibrational spectra and molecular structure investigation of nicotinamide: A combined experimental and theoretical study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Elsevier, v. 75, n. 5, p. 1552–1558, 2010.
- 168 YUE, K. T. et al. Raman spectroscopy of oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotides. **Biochemistry**, v. 25, p. 4941–4947, 1986. ISSN 15204995.
- 169 UCHINOKURA, K.; SEKINE, T.; MATSUURA, E. Raman scattering by silicon. **Solid State Communications**, Elsevier, v. 11, n. 1, p. 47–49, 1972.
- 170 ALONSO-GONZÁLEZ, P. et al. Resolving the electromagnetic mechanism of surface-enhanced light scattering at single hot spots. **Nature Communications**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2012.

- 171 BENZ, F. et al. Single-molecule optomechanics in “picocavities”. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 354, n. 6313, p. 726–729, 2016.
- 172 HARALICK, R. M.; SHANMUGAM, K.; DINSTEN, I. H. Textural features for image classification. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, IEEE, n. 6, p. 610–621, 1973.
- 173 PARK, Y.; GULDMANN, J.-M. Measuring continuous landscape patterns with gray-level co-occurrence matrix (GLCM) indices: An alternative to patch metrics? **Ecological Indicators**, Elsevier, v. 109, p. 105802, 2020.
- 174 ELEYAN, A.; DEMIREL, H. Co-occurrence matrix and its statistical features as a new approach for face recognition. **Turkish Journal of Electrical Engineering & Computer Sciences**, The Scientific and Technological Research Council of Turkey, v. 19, n. 1, p. 97–107, 2011.
- 175 LINDQUIST, N. C. et al. High-speed imaging of surface-enhanced Raman scattering fluctuations from individual nanoparticles. **Nature Nanotechnology**, Nature Publishing Group, v. 14, n. 10, p. 981–987, 2019.
- 176 ASPELMEYER, M.; KIPPENBERG, T. J.; MARQUARDT, F. Cavity optomechanics. **Reviews of Modern Physics**, APS, v. 86, n. 4, p. 1391, 2014.
- 177 KOYA, A. N. et al. Novel plasmonic nanocavities for optical trapping-assisted biosensing applications. **Advanced Optical Materials**, Wiley Online Library, v. 8, n. 7, p. 1901481, 2020.
- 178 BOTTER, T. et al. Linear amplifier model for optomechanical systems. **Phys. Rev. A**, American Physical Society, v. 85, p. 013812, Jan 2012. Disponível em: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevA.85.013812>.
- 179 SCHMIDT, M. K. et al. Quantum mechanical description of Raman scattering from molecules in plasmonic cavities. **ACS Nano**, ACS Publications, v. 10, n. 6, p. 6291–6298, 2016.
- 180 ROELLI, P. et al. Molecular cavity optomechanics as a theory of plasmon-enhanced Raman scattering. **Nature Nanotechnology**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 2, p. 164–169, 2016.
- 181 WANG, Z.; ROTHBERG, L. J. Origins of blinking in single-molecule Raman spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 8, p. 3387–3391, 2005. PMID: 16851369. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp0460947>.
- 182 PARK, K.-D. et al. Variable-temperature Tip-enhanced Raman spectroscopy of single-molecule fluctuations and dynamics. **Nano Letters**, ACS Publications, v. 16, n. 1, p. 479–487, 2016.
- 183 KE, P. C.; GU, M. Characterization of trapping force on metallic mie particles. **Applied Optics**, Optical Society of America, v. 38, n. 1, p. 160–167, 1999.
- 184 ZHANG, X. et al. Surface-enhanced Raman scattering from bowtie nanoaperture arrays. **Surface Science**, Elsevier, v. 676, p. 39–45, 2018.

- 185 SHARMA, S. K.; MAMMONE, J. F.; NICOL, M. F. Raman investigation of ring configurations in vitreous silica. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 292, n. 5819, p. 140–141, 1981.
- 186 MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 52, n. 1, p. 711–760, 1983.
- 187 JONES, D. P. et al. Redox state of glutathione in human plasma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 4, p. 625–635, 2000. ISSN 0891-5849. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584999002750>.
- 188 BLAIR, S. L. et al. Glutathione metabolism in patients with non-small cell lung cancers. **Cancer Research**, AACR, v. 57, n. 1, p. 152–155, 1997.
- 189 DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**, Elsevier, v. 64, n. 5-6, p. 1019–1026, 2002.
- 190 GULÇİN İlhami et al. Antidiabetic and antiparasitic potentials: Inhibition effects of some natural antioxidant compounds on α -glycosidase, α -amylase and human glutathione s-transferase enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 741–746, 2018. ISSN 0141-8130. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018335840>.
- 191 TEKIE, F. S. M. et al. Glutathione responsive chitosan-thiolated dextran conjugated mir-145 nanoparticles targeted with as1411 aptamer for cancer treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 131–140, 2018. ISSN 0144-8617. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718309615>.
- 192 GLUTATHIONE peroxidase-1 overexpressing transgenic mice are protected from neurotoxicity induced by microcystin-leucine-arginine. **Environmental Toxicology**, Wiley Online Library, v. 33, n. 10, p. 1019–1028, 2018.
- 193 BRIDGES, R. J. et al. Increased excitotoxic vulnerability of cortical cultures with reduced levels of glutathione. **European Journal of Pharmacology**, v. 192, n. 1, p. 199–200, 1991. ISSN 0014-2999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014299991900936>.
- 194 LIU, H. et al. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. In: ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, 2004, New York, **Annals**. [S.l.]: Wiley Online Library, 2004. v. 1019, n. 1, p. 346–349.
- 195 KIM, S. H. et al. The self-assembly of anticancer camptothecin–dipeptide nanotubes: a minimalistic and high drug loading approach to increased efficacy. **Chemistry–A European Journal**, Wiley Online Library, v. 21, n. 1, p. 101–105, 2015.
- 196 WANG, Y. et al. Mechanism study of gene delivery and expression in pk-15 cells using magnetic iron oxide nanoparticles as gene carriers. **Nano Life**, World Scientific, v. 4, n. 04, p. 1441018, 2014.
- 197 BOYSEN, G. The glutathione conundrum: Stoichiometric disconnect between its formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 5,

p. 1113–1116, 2017. PMID: 28426193. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00018>).

198 SAPPINGTON, D. R. et al. Glutamine drives glutathione synthesis and contributes to radiation sensitivity of a549 and h460 lung cancer cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 4, p. 836–843, 2016. ISSN 0304-4165. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416516300071>).

199 ZHANG, H. et al. Ultrasensitive fluorescent ratio imaging probe for the detection of glutathione ultratrace change in mitochondria of cancer cells. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 85, p. 96–102, 2016.

200 XU, K.; THORNALLEY, P. J. Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, Elsevier, v. 61, n. 2, p. 165–177, 2001.

201 BOUCHET, S. et al. Linking microbial activities and low-molecular-weight thiols to hg methylation in biofilms and periphyton from high-altitude tropical lakes in the bolivian altiplano. **Environmental Science & Technology**, ACS Publications, v. 52, n. 17, p. 9758–9767, 2018.

202 LIU, F. et al. Temperature-sensitive polymersomes for controlled delivery of anticancer drugs. **Chemistry of Materials**, ACS Publications, v. 27, n. 23, p. 7945–7956, 2015.

203 LIANG, X. et al. Thermoresponsive micelles from double lcst-poly(3-methyl-n-vinylcaprolactam) block copolymers for cancer therapy. **ACS Macro Letters**, v. 4, n. 3, p. 308–311, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/mz500832a>).

204 LIU, F. et al. Encapsulation of anticancer drug by hydrogen-bonded multilayers of tannic acid. **Soft Matter**, Royal Society of Chemistry, v. 10, n. 46, p. 9237–9247, 2014.

205 ZHU, H. et al. Folate-modified chitosan micelles with enhanced tumor targeting evaluated by near infrared imaging system. **Carbohydrate Polymers**, Elsevier, v. 86, n. 3, p. 1118–1129, 2011.

206 TAMASI, G. et al. Analytical and structural investigation via infrared spectroscopy and density functional methods of cuprous complexes of the antioxidant tripeptide glutathione (GSH). synthesis and characterization of a novel CuI-GSH compound. **Inorganica Chimica Acta**, v. 470, p. 158–171, 2018. ISSN 0020-1693. Special Volume: Protagonists in Chemistry Dedicated to Professor Carlo Mealli. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169317302967>).

207 STEWART, S.; FREDERICKS, P. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Elsevier, v. 55, n. 7-8, p. 1641–1660, 1999.

208 GIOKAS, D. L. et al. Nanoparticle-assisted chemiluminescence and its applications in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier, v. 29, n. 10, p. 1113–1126, 2010.

- 209 MACBEATH, G. Protein microarrays and proteomics. **Nature Genetics**, Nature Publishing Group, v. 32, n. 4, p. 526–532, 2002.
- 210 BAYRAM, B. et al. Rapid method for glutathione quantitation using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, ACS Publications, v. 62, n. 2, p. 402–408, 2014.
- 211 ZHAO, D. et al. Simultaneous detection of heavy metals by anodic stripping voltammetry using carbon nanotube thread. **Electroanalysis**, v. 26, n. 3, p. 488–496, 2014. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elan.201300511>.
- 212 WANG, T. et al. Carbon nanotube-loaded nafion film electrochemical sensor for metal ions: Europium. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 9, p. 4354–4361, 2014. PMID: 24673177. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac500163f>.
- 213 WANG, T. et al. Optically transparent carbon nanotube film electrode for thin layer spectroelectrochemistry. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 19, p. 9687–9695, 2015. PMID: 26291731. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01784>.
- 214 FAN, D. et al. Introducing ratiometric fluorescence to MnO₂ nanosheet-based biosensing: A simple, label-free ratiometric fluorescent sensor programmed by cascade logic circuit for ultrasensitive GSH detection. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 31, p. 25870–25877, 2017. PMID: 28696093. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsami.7b07369>.
- 215 NOLIN, T. D.; MCMENAMIN, M. E.; HIMMELFARB, J. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress. **Journal of Chromatography B**, Elsevier, v. 852, n. 1-2, p. 554–561, 2007.
- 216 YOSHIDA, T. Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Elsevier, v. 678, n. 2, p. 157–164, 1996.
- 217 HU, B.; CAO, X.; ZHANG, P. Selective colorimetric detection of glutathione based on quasi-stable gold nanoparticles assembly. **New Journal of Chemistry**, The Royal Society of Chemistry, v. 37, n. 12, p. 3853–3856, 2013.
- 218 GUAN, X. et al. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Elsevier, v. 31, n. 2, p. 251–261, 2003.
- 219 IWASAKI, Y. et al. Analysis of glutathione and glutathione disulfide in human saliva using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Elsevier, v. 839, n. 1-2, p. 74–79, 2006.
- 220 GIL, A. et al. LC-MS analysis of key components of the glutathione cycle in tissues and body fluids from mice with myocardial infarction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Elsevier, v. 160, p. 289–296, 2018.

- 221 YAO, Z. et al. Conjugated polyelectrolyte as a colorimetric and fluorescent probe for the detection of glutathione. **Chemical Communications**, Royal Society of Chemistry, n. 39, p. 5886–5888, 2009.
- 222 LI, Y. et al. Anti-aggregation of gold nanoparticle-based colorimetric sensor for glutathione with excellent selectivity and sensitivity. **Analyst**, Royal Society of Chemistry, v. 136, n. 1, p. 196–200, 2011.
- 223 FENG, B. et al. A sensitive LSPR sensor based on glutathione-functionalized gold nanoparticles on a substrate for the detection of Pb²⁺ ions. **RSC Advances**, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 8, p. 4049–4056, 2018.
- 224 OPSTAD, K. et al. Detection of elevated glutathione in meningiomas by quantitative in vivo 1H MRS. **Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine**, Wiley Online Library, v. 49, n. 4, p. 632–637, 2003.
- 225 MANDAL, P. K.; TRIPATHI, M.; SUGUNAN, S. Brain oxidative stress: detection and mapping of anti-oxidant marker ‘glutathione’ in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Elsevier, v. 417, n. 1, p. 43–48, 2012.
- 226 LI, P. et al. Metal coordination-functionalized Au–Ag bimetal SERS nanoprobe for sensitive detection of glutathione. **Analyst**, The Royal Society of Chemistry, v. 144, p. 421–425, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C8AN02206B>.
- 227 MAYER, K. M. et al. A label-free immunoassay based upon localized surface plasmon resonance of gold nanorods. **ACS Nano**, v. 2, n. 4, p. 687–692, 2008. PMID: 19206599. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/nn7003734>.
- 228 NUSZ, G. J. et al. Label-free plasmonic detection of biomolecular binding by a single gold nanorod. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 984–989, 2008. PMID: 18197636. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac7017348>.
- 229 RASCHKE, G. et al. Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering. **Nano Letters**, v. 3, n. 7, p. 935–938, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/nl034223+>.
- 230 CAO, N. et al. Au@SiO₂@RuDS nanocomposite based plasmon-enhanced electrochemiluminescence sensor for the highly sensitive detection of glutathione. **Talanta**, v. 204, p. 402–408, 2019. ISSN 0039-9140. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914019306551>.
- 231 WANG, D. et al. Surface enhanced electrochemiluminescence of Ru (bpy) 3 2+. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2015.
- 232 BRAMBILLA, A. et al. Adapting and testing a portable Raman spectrometer for SERS analysis of amino acids and small peptides. **Journal of Molecular Structure**, Elsevier, v. 1044, p. 121–127, 2013.

- 233 GIUSTARINI, D. et al. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and s-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. **Free Radical Biology and Medicine**, Elsevier, v. 112, p. 360–375, 2017.
- 234 POWELL, J. A.; VENKATAKRISHNAN, K.; TAN, B. A primary SERS-active interconnected Si-nanocore network for biomolecule detection with plasmonic nanosatellites as a secondary boosting mechanism. **RSC Advances**, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 53, p. 33688–33700, 2017.
- 235 HUANG, G. G. et al. Development of a heat-induced surface-enhanced Raman scattering sensing method for rapid detection of glutathione in aqueous solutions. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 81, n. 14, p. 5881–5888, 2009.
- 236 GELDER, J. D. et al. Reference database of Raman spectra of biological molecules. **Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering**, Wiley Online Library, v. 38, n. 9, p. 1133–1147, 2007.
- 237 BIERI, M.; BÜRGI, T. L-glutathione chemisorption on gold and acid/base induced structural changes: A PM-IRRAS and time-resolved in situ ATR-IR spectroscopic study. **Langmuir**, ACS Publications, v. 21, n. 4, p. 1354–1363, 2005.
- 238 GARFINKEL, D. Raman spectra and ultraviolet absorption of glutathione and possible thiazoline derivatives formed from it1, 2. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 80, n. 18, p. 4833–4835, 1958.
- 239 PICQUART, M. et al. Vibrational spectroscopic study of glutathione complexation in aqueous solutions. **Biospectroscopy**, Wiley Online Library, v. 5, n. 6, p. 328–337, 1999.
- 240 YEO, B.-S. et al. A strategy to prevent signal losses, analyte decomposition, and fluctuating carbon contamination bands in surface-enhanced Raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, OSA, v. 62, n. 6, p. 708–713, Jun 2008. Disponível em: <http://www.osapublishing.org/as/abstract.cfm?URI=as-62-6-708>.
- 241 LIU, Y.-C.; MCCREERY, R. L. Reactions of organic monolayers on carbon surfaces observed with unenhanced Raman spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 45, p. 11254–11259, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00150a024>.
- 242 ZITKA, O. et al. Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. **Oncology letters**, Spandidos Publications, v. 4, n. 6, p. 1247–1253, 2012.
- 243 MYTILINEOU, C.; KRAMER, B. C.; YABUT, J. A. Glutathione depletion and oxidative stress. **Parkinsonism & related disorders**, Elsevier, v. 8, n. 6, p. 385–387, 2002.
- 244 BAKILER, M.; BOLUKBASI, O.; YILMAZ, A. An experimental and theoretical study of vibrational spectra of picolinamide, nicotinamide, and isonicotinamide. **Journal of Molecular Structure**, v. 826, p. 6–16, 1 2007. ISSN 00222860.

- 245 RAMALINGAM, S. et al. FT-IR and FT-Raman vibrational spectra and molecular structure investigation of nicotinamide: A combined experimental and theoretical study. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, p. 1552–1558, 5 2010. ISSN 13861425.
- 246 BALAVANDY, S. K. et al. Stirring time effect of silver nanoparticles prepared in glutathione mediated by green method. **Chemistry Central Journal**, BioMed Central, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2014.
- 247 FRANCL, M. M. et al. Self-consistent molecular orbital methods. XXIII. a polarization-type basis set for second-row elements. **The Journal of Chemical Physics**, American Institute of Physics, v. 77, n. 7, p. 3654–3665, 1982.
- 248 GLUŠIČ, M. et al. The binding sites of cadmium to a reduced form of glutathione. **Acta Chimica Slovenica**, v. 60, n. 1, p. 61–69, 2013.
- 249 DECKERT-GAUDIG, T.; BAILO, E.; DECKERT, V. Tip-enhanced Raman scattering (TERS) of oxidised glutathione on an ultraflat gold nanoplate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, The Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 34, p. 7360–7362, 2009.
- 250 COMPAGNINI, G. et al. A combined Raman and XPS study of the effects induced on glutathione by ion beam irradiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, Elsevier, v. 116, n. 1-4, p. 242–245, 1996.
- 251 OUYANG, L. et al. A surface-enhanced Raman scattering method for detection of trace glutathione on the basis of immobilized silver nanoparticles and crystal violet probe. **Analytica Chimica Acta**, Elsevier, v. 816, p. 41–49, 2014.
- 252 LARSSON, M.; LINDGREN, J. Analysis of glutathione and immunoglobulin G inside chromatographic beads using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering**, Wiley Online Library, v. 36, n. 5, p. 394–399, 2005.
- 253 BECKE, A. D. Becke's three parameter hybrid method using the LYP correlation functional. **J. Chem. Phys.**, v. 98, n. 492, p. 5648–5652, 1993.
- 254 LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, APS, v. 37, n. 2, p. 785, 1988.
- 255 RUSH, T. S. et al. Computational modeling of metalloporphyrin structure and vibrational spectra: Porphyrin ruffling in nitpp. **The Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 104, n. 20, p. 5020–5034, 2000.
- 256 SHIMANOUCI, T. et al. Tables of molecular vibrational frequencies part 10. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, American Institute of Physics for the National Institute of Standards and . . . , v. 9, n. 4, p. 1149–1254, 1980.

- 257 SAINI, G. et al. Rhodamine 6G interaction with solvents studied by vibrational spectroscopy and density functional theory. **Journal of Molecular Structure**, Elsevier, v. 931, n. 1-3, p. 10–19, 2009.
- 258 QIAN, W.; KRIMM, S. Vibrational analysis of glutathione. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, Wiley Online Library, v. 34, n. 10, p. 1377–1394, 1994.
- 259 HEPPEL, M.; STOBIECKA, M. Comparative kinetic model of fluorescence enhancement in selective binding of monochlorobimane to glutathione. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Elsevier, v. 225, n. 1, p. 72–80, 2011.
- 260 PICQUART, M. et al. Vibrational spectroscopic study of glutathione complexation in aqueous solutions. **Biospectroscopy**, Wiley Online Library, v. 5, n. 6, p. 328–337, 1999.
- 261 GLUŠIČ, M. et al. Binding of cadmium dication to glutathione facilitates cysteine SH deprotonation: A computational dft study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Elsevier, v. 119, p. 90–94, 2013.
- 262 GRAVES, P.; GARDINER, D. Practical Raman spectroscopy. **Springer**, Springer, v. 10, p. 978–3, 1989.
- 263 KONINGSTEIN, J. A. **Introduction to the Theory of the Raman Effect**. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2012.
- 264 YEE, K. Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell's equations in isotropic media. **IEEE Transactions on Antennas and Propagation**, v. 14, n. 3, p. 302–307, 1966.
- 265 YU, W. **Electromagnetic simulation techniques based on the FDTD method**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2009. v. 221.
- 266 CHEN, W. K. **The electrical engineering handbook**. [S.l.]: Elsevier, 2004.
- 267 KUNZ, K. S.; LUEBBERS, R. J. **The finite difference time domain method for electromagnetics**. [S.l.]: CRC press, 1993.
- 268 TAFLOVE, A. Computational electromagnetics: The finite difference method. **Artech House, Norwood, MA**, 1995.
- 269 SHLAGER, K. L.; SCHNEIDER, J. B. A selective survey of the finite-difference time-domain literature. **IEEE Antennas and Propagation Magazine**, IEEE, v. 37, n. 4, p. 39–57, 1995.
- 270 SULLIVAN, D. M. **Electromagnetic simulation using the FDTD method**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2013.
- 271 TAFLOVE, A.; OSKOOI, A.; JOHNSON, S. G. **Advances in FDTD computational electrodynamics: photonics and nanotechnology**. [S.l.]: Artech house, 2013.

APÊNDICE A – ATRIBUIÇÕES DAS LINHAS DE NAD E GSH OBTIDAS EM NANOCILINDROS

Tabela 4 – Picos SERS de NAD encontrados em nanocilindros de 63 nm de diâmetro em diferentes potências e suas respectivas atribuições.

Localização (cm^{-1})						Atribuição
7 mW Fig. (25)	3,5 mW Fig. (26)	700 μW Fig. (27)	350 μW Fig. (29)	35 μW Fig. (30)	70 nW Fig. (31)	
562	610	587	559	583	-	-
618	616	624	625	615	-	0.5A + 0.5Nic (164)
647	638	646	651	639	-	0.5A + 0.5Nic (164)
673	688	678	665	701	694	-
-	719	722	721	717	704	A (168)
730	748	735	728	734	-	A (164, 165, 168) + δR1 (168)
806	791	781	781	799	-	R + pirofosfato (102) + R2 + Nic (168)
816	815	811	811	823	-	R (164, 165)
832	843	833	831	838	-	Fosfato (146)
867	847	851	868	846	-	R1 + Fosfato (168)
878	887	886	882	882	-	Fosfato (168)
902	911	902	932	907	924	Fosfato (164, 168)
942	937	941	950	943	-	-
971	985	960	962	956	957	P-O(H) (120)
-	996	999	997	996	-	-
1028	1017	1037	1009	1027	1037	Nic anel str (164, 165, 168, 244)

Continua

Continuação

Localização (cm ⁻¹)						Atribuição
7 mW Fig. (25)	3,5 mW Fig. (26)	700 μ W Fig. (27)	350 μ W Fig. (29)	35 μ W Fig. (30)	70 nW Fig. (31)	
1052	-	1055	1059	1060	-	-
1069	1086	1067	1074	1092	-	Fosfato (164, 168)
1112	1130	1120	1128	1128	-	R2 (164, 165, 168) + PO ₂ str (146, 165) + pirofosfato (168)
1143	1160	1142	1155	1136	-	-
1172	1162	1164	1186	1176	-	R2 + Nic (164, 165, 168)
1189	1207	1204	1199	1201	-	P-O(C) (120)
1216	1210	1217	1215	1210	-	-
1229	1232	1247	1238	1244	-	O-H (120)
1256	1252	1254	1262	1261	-	PO ₂₋ + A (120, 164, 168)
1275	1283	1277	1269	1266	1281	A (164)
1302	1305	1305	1291	1306	1301	A (168)
1319	1325	1322	1327	-	-	A anel + NH ₂ rock (164, 165)
1359	1349	1348	1343	1345	-	A + δ R1 + P=O (120, 146, 164, 165, 168)
1372	1381	1368	1372	1367	-	A (164, 165, 168) + R1 (168)
1392	1393	1394	1392	1394	-	A (164)
1395	1398	1409	1411	1397	1411	0.5A + 0.5Nic (164)
1425	1425	1424	1422	1418	-	0.5A + δ R1 + 0.5Nic (164, 168)
1433	1432	1435	1436	1432	-	A anel + Nic (152)
-	1462	1462	1455	1462	-	R2 (146, 168) + δ Nic (152, 168) + A anel (152)
-	1467	1463	1464	1473	-	A anel (164, 165) + ν (C6-NH ₂) (164)
1477	1484	1478	1491	1487	-	NMN (146) + A anel (152, 168)
1498	1498	1500	1497	1497	1502	- (165)
1526	1519	1517	1507	1525	1510	A anel (164, 168) + δ R1 (168)
1533	1532	1533	1532	1532	-	-
1552	1541	1558	1537	1536	1543	A (164, 165)

Continua

Continuação

Localização (cm ⁻¹)						Atribuição
7	3,5	700	350	35	70	
mW	mW	μW	μW	μW	nW	
Fig.	Fig.	Fig.	Fig.	Fig.	Fig.	
(25)	(26)	(27)	(29)	(30)	(31)	
1572	1575	1574	1564	-	-	A (164) + Nic (164, 165) + (N-H)τ (Nic) (245)
1589	1585	1579	1577	1578	-	0.8A (152, 168) + δR1 + 0.2Nic (168) + NH ₂ (152)
1595	1611	1592	1596	1590	1599	Nic anel (164, 165)
-	1622	1630	1613	1620	-	Amide I (Nic), ν(C=O) (164) + Nic (165, 168)
1636	-	1637	1636	1639	-	CONH ₂ NH ₂ bend (Nic) (152)
-	1641	1642	1646	1641	-	C=O (120)
-	1653	1651	1651	1653	-	C=O str (Nic) (152)
-	1672	1679	1670	1672	-	C=O str (Nic) (152)
-	1689	1705	1705	1700	-	C=O str (Nic) (146, 245)
-	1750	1722	1735	1754	-	-

Conclusão.

Grupos da molécula NAD: Nic, nicotinamida; A, adenina; NMN, mononucleotídeo de nicotinamida; R, ribose; R1, ribose próxima da A; R2, ribose próxima da Nic; pir., pirofosfato; e fosf., fosfato.

Tabela 5 – Picos SERS de GSH encontrados em nanocilindros de 58 nm de diâmetro em diferentes potências e linhas Raman da GSH em forma de pó.

Localização (cm ⁻¹)				Atribuição (109)
7 mW Fig. (43)	3,5 mW Fig. (44)	700 μ W Fig. (45)	Pó GSH Fig. (40)	
165	151	165	-	$\kappa(\text{C-C-C=O})$ (246)
197	-	204	-	$\tau(\text{C-N-C})$ (236)
227	213	227	220	$[\tau(\text{C-C-C}) + \tau(\text{C-C-N})]$ (247)
236	243	251	-	$\kappa(\text{C-C-N-C})$ (248) + $\kappa(\text{H-S-C-C})$ (109)
271	273	269	-	$\tau(\text{S-C-C})$ (109)
279	-	279	287	$\tau(\text{C-C-C})$ (249) + $\tau(\text{C-C-C})$ (246)
302	306	304	-	$\tau(\text{C-C-N})$ (237) + $\tau(\text{N-C-C})$ (236) + $\tau(\text{C-N-C})$ (237)
-	-	332	-	$\tau(\text{C-C-N})$ (246) + $\tau(\text{O-C-N})$ (246)
-	-	357	350	(N-H) <i>twist</i> (250)
-	359	-	-	$\tau(\text{C-C-O})$ (246) + (N-H) <i>twist</i> (109)
390	378	379	-	$\tau(\text{N-C-C})$ (247)
408	396	419	401	$\tau(\text{O-C-C})$ (251)
-	-	424	-	-
446	438	463	447	$\kappa(\text{C-N-C-C})$ (246)
478	473	495	478	$\tau(\text{H-S-H})$ (109) + $\tau(\text{O-C-C})$ (249)
-	-	519	-	$\tau(\text{O-C-O})$ (246) + $\tau(\text{C-C-O})$ (237)
-	-	556	549	<i>str(C-H)rock</i> (246) + $\kappa(\text{O-C-O-C})$ (247)
566	569	577	-	<i>str(C-H)rock</i> (237) + $\kappa(\text{O-C-O-C})$ (109)
588	-	602	-	-
623	621	610	623	$\tau(\text{O-C-C})$ (252)
651	640	644	-	<i>str(C-C)</i> (246)
658	-	660	-	<i>str(S-C)</i> (253) + $\tau(\text{O-C-N})$ (246)
682	685	673	679	<i>str(S-C)</i> (252) + $\tau(\text{O-C-O})$ (109)
709	703	702	-	$\tau(\text{O-C-O})$ (236) + $\tau(\text{C-C-O})$ (246)
716	717	717	723	$\tau(\text{O-C-O})$ (238)
735	-	741	-	$\kappa(6\text{C-O-O-C})$ (109)
759	761	754	-	<i>str(C-H)rock</i> (109)

Continua

Continuação

Localização (cm ⁻¹)				Atribuição (109)
7 mW Fig. (43)	3,5 mW Fig. (44)	700 μ W Fig. (45)	Pó GSH Fig. (40)	
762	-	763	-	$\tau(\text{C-C-N})$ (246) + $\kappa(\text{O-C-N-C})$ (238) + $\kappa(\text{6C-O-O-C})$ (251)
782	-	794	776	$\text{str}(\text{C5-H2})\text{rock}$ (109) + $\text{str}(\text{C4-H2})\text{rock}$ (254)
808	809	825	-	$\text{str}(\text{S-C})$ (250) + $\tau(\text{C-C-C})$ (246) + $\text{str}(\text{C-H})\text{rock}$ (255)
848	845	835	829	$\tau(\text{H-N-C})$ (248) + $\kappa(\text{H-N-C-C})$ (109)
859	-	859	-	$\kappa(\text{H-N-C-C})$ (109)
-	873	868	-	$\kappa(\text{H-N-C-C})$ (109)
890	886	880	884	$\text{str}(\text{C-C})$ (251)
907	-	907	916	$\text{str}(\text{C-C})$ (249) + $\tau(\text{H-S-C})$ (252)
941	-	933	-	$\text{str}(\text{C-C})$ (249) + $(\text{C-H})\text{rock}$ (238)
956	954	954	953	$\text{str}(\text{C-C})$ (238) + $(\text{C-H})\text{rock}$ (246)
985	985	982	989	$\kappa(\text{O-C-O-H})$ (109)
-	996	1004	-	$\kappa(\text{O-C-O-H})$ (109)
1009	1019	1018	1014	$\text{str}(\text{C-C})$ (109)
1034	-	1031	-	$\text{str}(\text{C-C})$ (109) + $(\text{C-H})\text{rock}$ (256)
1041	1039	1057	1041	$\text{str}(\text{C-C})$ (257) + $(\text{C-H})\text{rock}$ (237) + $(\text{C-H})\text{rock}$ (237)
1080	1072	1068	1074	$\text{str}(\text{N-C})$ (109) + $\text{str}(\text{C-C})$ (258) + $(\text{C-H})\text{rock}$ (109) + $\tau(\text{C-S-H})$ (109)
1102	-	1097	-	$\text{str}(\text{N-C})$ (257) + $\text{str}(\text{N-C})$ (252) + $\text{str}(\text{C-C})$ (252)
1113	1117	1116	1114	$\text{str}(\text{N-C})$ (237) + $\text{str}(\text{N-C})$ (247)
1125	1122	1131	-	$\text{str}(\text{N-C})$ (247)
-	1144	1153	1143	$\text{str}(\text{N-C})$ (259) + $\tau(\text{H-N-C})$ (237) + $(\text{C-H})\text{twist}$ (109) + $(\text{C-H})\text{twist}$ (249)
1183	1170	1181	1170	$\text{str}(\text{O-C})$ (236) + $\tau(\text{H-N-C})$ (246) + $\iota(\text{C-H})$ (237)
1197	1203	1213	-	-
1236	1219	1223	1223	$(\text{C-H})\text{twist}$ (109) + $\iota(\text{H-C})$ (236)
1246	-	1246	-	$(\text{C-H})\text{twist}$ (109)
1251	-	-	-	$\text{str}(\text{O-C})$ (253) + $(\text{C-H})\text{twist}$ (257)
1269	1260	1272	-	$\tau(\text{H-C-C})$ (257) + $(\text{C-H})\text{twist}$ (252) + $(\text{C-H})\text{wagg}$ (109)

Continua

Continuação

Localização (cm ⁻¹)				Atribuição (109)
7 mW Fig. (43)	3,5 mW Fig. (44)	700 μ W Fig. (45)	Pó GSH Fig. (40)	
1281	1275	1281	1280	str(O-C) (248) + (C-H)wagg (109)
1298	1294	-	-	str(N-C)(237) + (C-H)wagg (109)
1319	-	1314	1308	(C-H) <i>twist</i> (109) + (C-H)wagg (109)
1327	1326	1326	-	str(O-C) (109) + ι (H-C)
1341	1334	1339	1333	(C-H) <i>twist</i> (237) + ι (H-C) (109)
1349	1351	1351	-	str(N-C) (109) + ι (H-C) (237) + ι (H-C) (237)
1367	1357	1362	1368	τ (H-O-C)(251) + (C-H)wagg (109)
1372	1384	1390	-	(C-H)wagg (248) +(C-H)wagg (109)
1394	1395	1406	-	str(N-C) (237) + τ (H-C-C) (109)
1408	-	-	1404	τ (H-C-N) (109) + τ (C-O-H) (238)
1426	-	1427	-	τ (H-O-C) (237) + (C-H)scis (109)
-	1435	1438	1443	τ (H-O-C) (260) + (C-H)scis (109)
1452	-	-	-	(C-H)scis (94)
1468	1468	1471	-	(C-H)scis (257) + (C-H)scis (109)
1482	1514	1493	1491	(C-H)scis (109) + (C-H)scis (261)
1525	1527	1537	1536	str(N-C) (238) + τ (H-N-C) (109)
1557	1550	1558	-	str(N-C) (259) + τ (H-N-C) (109)
1585	1594	1581	-	(N-H)scis (109)
1616	1611	1619	-	str[(O=C)+(O=C)]sym (109)
-	-	1637	1631	str[(O=C)+(O=C)]asym (109)
-	1651	1658	-	str(O=C) (109)
-	-	1682	-	-
-	1700	1703	1705	str(O=C) (109)
1737	-	-	-	-
-	-	1777	-	-

Conclusão.

Os significados dos símbolos e abreviações encontrados nas Tabelas 4 e 5 são: Modos vibracionais: str, *stretching*; wagg, *wagging*; bend, *bending*; scis, *scissor*; rock; *twist*; sym,

movimento simétrico; *asym*, movimento assimétrico; δ , pequena influência; κ , torção; τ , *bending* no plano; e ι , *bending* fora do plano.

APÊNDICE B – EXTRAÇÃO DE PARÂMETROS DA CURVA DA BANDA DA CAVIDADE PLASMÔNICA

A partir da curva de intensificação de campo em função do comprimento de onda mostrada nas Figuras 34a e 35, foram calculados o fator de qualidade Q e a largura da banda plasmônica em número de onda com unidades em cm^{-1} . A Figura 34a teve as escalas dos eixos reajustadas e alguns parâmetros da banda da cavidade plasmônica foram apontados, como mostra a Figura 48.

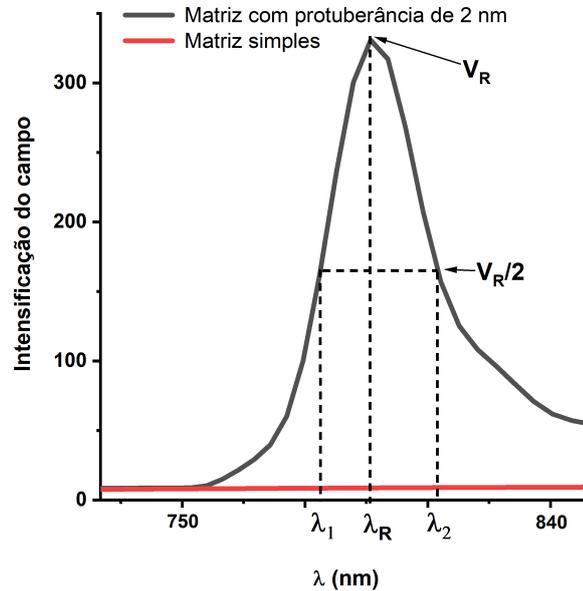


Figura 48 – Gráfico da Figura 34a com indicação de parâmetros.

Na Figura 48, V_R é a intensificação de campo máxima, λ_R é o comprimento de onda correspondente à intensificação de campo máxima. Ao se traçar uma linha horizontal em $V_R/2$, encontram-se os valores correspondentes de comprimento de onda λ_1 e λ_2 . A diferença entre estes valores é igual a largura de banda do plasmon $\Delta\lambda$. Para cada valor de λ há um valor de intensificação V correspondente, pois:

$$c = \lambda_i \times V_i \quad (\text{B.1})$$

Onde c é a velocidade da luz igual a 299.792.458 m/s; e $i = 1, 2$ ou R. A largura da banda plasmônica $\Delta\lambda$ é dada por $\lambda_2 - \lambda_1$, portanto, a partir da Eq. B.1 nota-se que $\Delta\lambda$ possui uma diferença ΔV correspondente, dada por:

$$\Delta V = V_2 - V_1 = \frac{c}{\lambda_2} - \frac{c}{\lambda_1} = \frac{c\Delta\lambda}{\lambda_1\lambda_2} \quad (\text{B.2})$$

E o fator de qualidade Q é dado por:

$$Q = \frac{V_R}{\Delta V} = \frac{\lambda_1\lambda_2}{\lambda_R\Delta\lambda} \quad (\text{B.3})$$

Na Figura 48, $\lambda_1=785$ nm (laser de excitação), $\lambda_2=815$ nm, e $\lambda_R= 796$ nm, como visto na Figura 34a. Fazendo as substituições, encontra-se $Q\approx 27$ e a largura de banda é 30 nm. Para encontrar a largura de banda $\Delta\lambda$ em número de onda, em cm^{-1} , deslocada para o vermelho em relação ao laser de excitação:

$$2\pi \frac{\Delta\lambda}{\lambda_1\lambda_2} = 2946 \text{ cm}^{-1} \quad (\text{B.4})$$

De modo análogo, a distância de energia entre o λ do laser de excitação (785 nm) e o λ do pico da banda plasmônica (796 nm) é dado por:

$$2\pi \frac{\lambda_R - \lambda_1}{\lambda_1\lambda_R} = 1106 \text{ cm}^{-1} \quad (\text{B.5})$$

ANEXO A – ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman revela a composição química de amostras sólidas ou líquidas. Esta técnica permite se observar os modos vibracionais das moléculas presentes em uma amostra, estes modos estão associados às ligações interatômicas presentes na molécula em análise. O conjunto de modos vibracionais é mostrado no espectro Raman, este espectro é característico para cada tipo de molécula e, portanto, atua como uma “impressão digital molecular”.

Ao se iluminar a amostra com uma luz monocromática (laser), parte da luz incidente é transmitida, refletida ou absorvida pela amostra, enquanto outra parte é espalhada. Quase toda a luz espalhada pela amostra possui a mesma energia (frequência) que a luz incidente e não contribui para o efeito Raman, este espalhamento é chamado de elástico ou Rayleigh. No entanto, uma pequena fração da luz espalhada possui energia diferente da luz incidente, este espalhamento é chamado de inelástico ou Raman. Isso ocorre porque neste caso há troca de energia entre a luz incidente e os modos vibracionais da molécula. A luz espalhada pela molécula com menor energia que a do laser de excitação é chamada de espalhamento Raman do tipo Stokes. E a luz espalhada pela molécula com maior energia que a do laser de excitação é chamada de espalhamento Raman do tipo anti-Stokes. A Figura 49 mostra o diagrama de bandas de energia de espalhamento Rayleigh e espalhamento Raman dos tipos Stokes e anti-Stokes, onde E_0 é a energia do laser de excitação e E é a energia espalhada pela molécula (262).

Na Figura 49, as transições que começam em um nível vibracional de energia e terminam em um nível de maior energia dão origem ao espalhamento do tipo Stokes. As transições que começam e terminam no mesmo nível vibracional de energia dão origem ao espalhamento Rayleigh. E as transições que terminam em um nível vibracional de energia inferior ao que começaram dão origem ao espalhamento do tipo anti-Stokes. Como em temperatura ambiente a maioria das vibrações moleculares está no nível de energia $E=0$, o espalhamento Stokes é mais intenso que o anti-Stokes (262).

A energia da luz é proporcional à sua frequência, que por sua vez é tradicionalmente

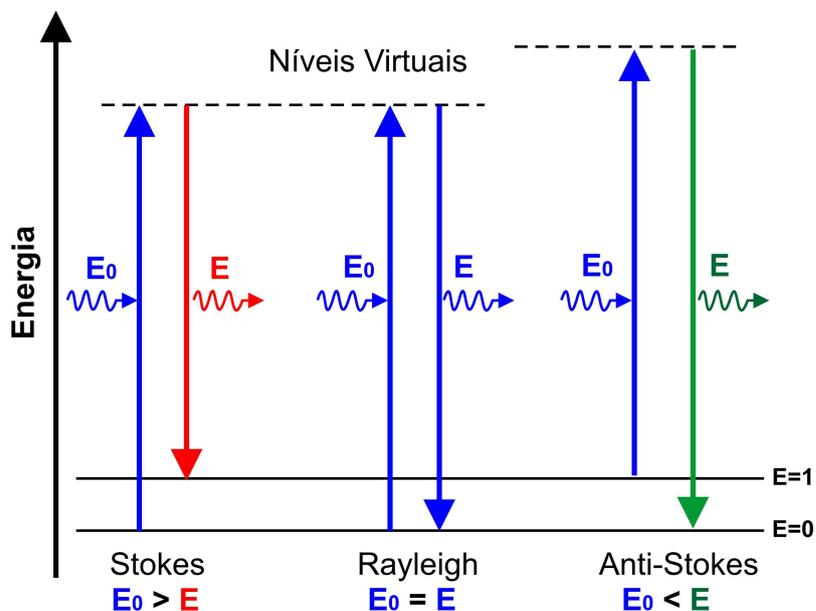


Figura 49 – Modelo idealizado de espalhamento Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes.

Fonte: (262)

medida em uma unidade chamada de número de onda (número de ondas por centímetro) cuja unidade de medida é (cm^{-1}). O eixo horizontal de um espectro Raman é a diferença entre o número de onda do laser de excitação e o número de onda da luz espalhada inelasticamente, essa diferença também é chamada de deslocamento Raman (*Raman Shift*) e é dado em cm^{-1} . Os deslocamentos Raman das linhas de um espectro fornecem informações sobre as ligações interatômicas existentes na molécula. Mais detalhes sobre a espectroscopia Raman podem ser encontrados em (262), e a teoria do efeito Raman está disponível em (263).

ANEXO B – O MÉTODO FDTD

O método FDTD (*Finite-Difference Time-Domain*) é uma técnica numérica utilizada para resolver as equações de Maxwell no domínio do tempo e do espaço. Como se sabe, as leis de Faraday (Eq. B.1) e Ampère (Eq. B.2) também são as equações de Maxwell que descrevem o comportamento dos campos elétrico \vec{E} e magnético \vec{H} no domínio do tempo. Ao resolver numericamente estas equações, a propagação de ondas eletromagnéticas pode ser simulada pelo método FDTD com o auxílio de um computador (264–266).

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} - \vec{M} \quad (\text{B.1})$$

$$\nabla \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{J} \quad (\text{B.2})$$

$$\vec{B} = \mu \vec{H} \quad (\text{B.3})$$

$$\vec{D} = \varepsilon \vec{E} \quad (\text{B.4})$$

Onde \vec{D} é a densidade de fluxo elétrico (C/m²), \vec{B} é a densidade de fluxo magnético (Wb/m²), \vec{J} é a densidade de corrente elétrica (A/m²), \vec{M} é a densidade de corrente magnética equivalente (V/m²), μ é a permeabilidade magnética (H/m), e ε é a permissividade elétrica (F/m). Após fazer as substituições e rearranjar os termos, \vec{E} e \vec{H} para o caso tridimensional são dados por:

$$\frac{\partial \vec{E}}{\partial t} = \frac{1}{\varepsilon} (\nabla \times \vec{H} - \vec{J}) \quad (\text{B.5})$$

$$\frac{\partial \vec{H}}{\partial t} = \frac{1}{\mu} (\nabla \times \vec{E} + \vec{M}) \quad (\text{B.6})$$

Em 1966, Yee criou um método para resolver as equações de Maxwell dependentes do tempo (Eqs. B.5 e B.6), isso deu origem a um algoritmo que é a base da técnica FDTD (264). A Figura 50 ilustra o algoritmo de Yee no espaço tridimensional onde os centros correspondem ao \vec{E} e as bordas correspondem ao \vec{H} . Cada componente do rotacional de \vec{H} é cercada por quatro componentes circulantes de \vec{E} (Fig. 51a) e vice-versa (Fig. 51b). A Figura 51c ilustra \vec{E} e \vec{H} nos centros e nas bordas de dois cubos acoplados em uma imagem tridimensional com os rotacionais e contornos das leis de Faraday e Ampère. Portanto, o algoritmo de Yee simula as equações de Maxwell tanto na forma pontual diferencial quanto na forma integral (266).

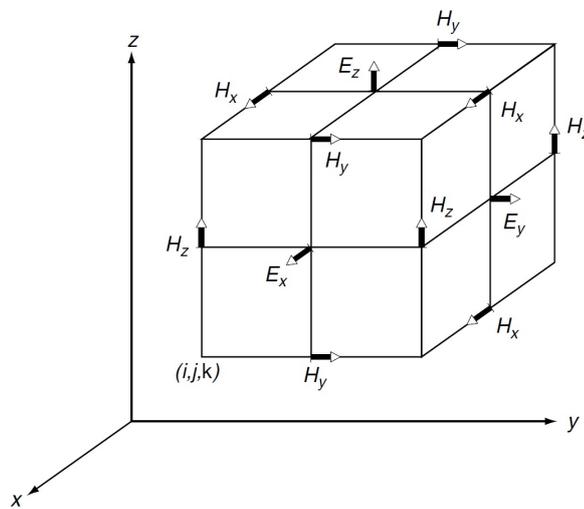


Figura 50 – Célula unitária cúbica de Yee.
Fonte: (264)

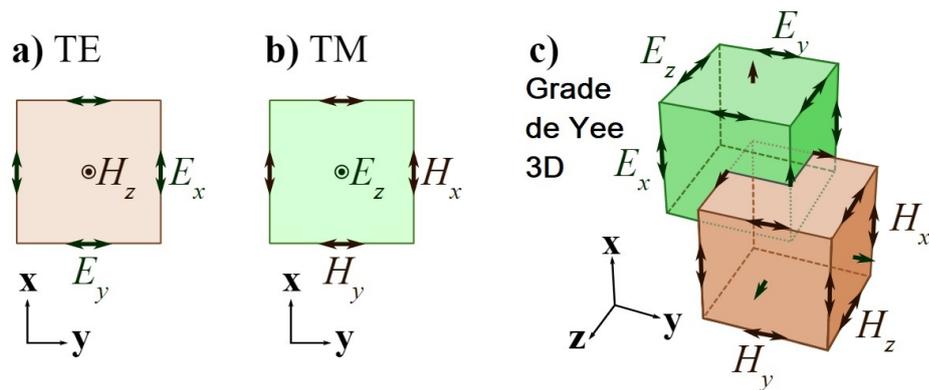


Figura 51 – (a) modo TE, (b) modo TM e (c) grade de Yee tridimensional.
Fonte: (264)

No modo TE (Fig. 51a), a componente \vec{H}_z do campo magnético é normal à superfície da face e perpendicular às componentes \vec{E}_x e \vec{E}_y do campo elétrico nas bordas do cubo. No modo TM (Fig. 51b), a componente \vec{E}_z é normal à face e \vec{H}_x e \vec{H}_y estão nas bordas do

cubo. Uma rede espacial tridimensional de Yee consiste em uma multiplicidade de células de Yee (Fig. 51c) (264).

O algoritmo de Yee acopla as equações B.5 e B.6 em sequência e as resolve iterativamente ao longo do tempo, então \vec{E} é calculado a partir de \vec{H} e vice-versa. Yee denominou este modo de calcular-se continuamente \vec{E} e \vec{H} de *leapfrog*, ou salto do sapo. Inicialmente os valores dos campos são igualados a zero, em seguida os valores calculados de \vec{E} no espaço são armazenados para $t=0$ usando os valores armazenados de \vec{H} . Então em $t = 0,5\Delta t$ todos os valores de \vec{H} são calculados no espaço usando os valores de \vec{E} e armazenados na memória. O ciclo recomeça e este processo continua até que aquele passo no tempo esteja concluído. A Figura 52 ilustra este processo com um gráfico espaço-tempo para propagação de onda em uma dimensão (266).

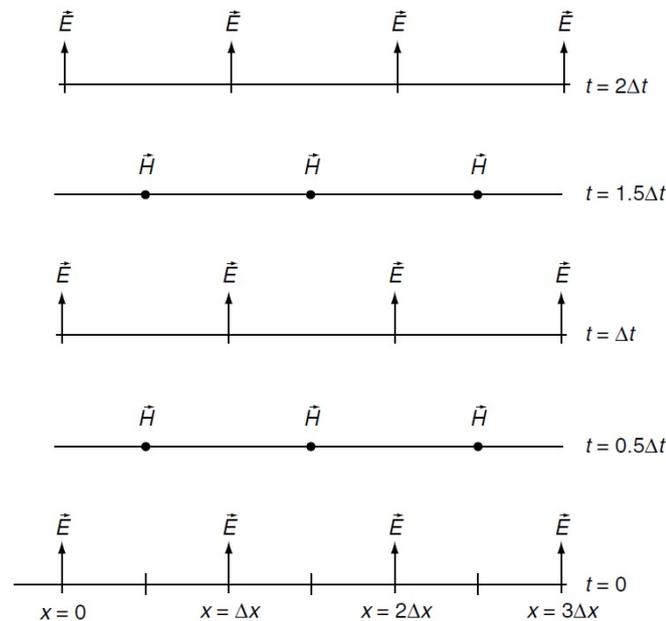


Figura 52 – Gráfico de espaço vs. tempo do algoritmo referente à propagação de uma onda eletromagnética.

Fonte: (264, 266)

No presente estudo, a plataforma Lumerical FDTD utilizou nos cálculos as propriedades dos materiais que compõe as matrizes de nanocilindros, as imagens MEV e as espessuras dos nanocilindros e do SiO₂. O FDTD é um método robusto e largamente utilizado nas mais diversas aplicações. Mais detalhes sobre este método podem ser encontrados em (267–271).

ANEXO C – OSCILADOR HARMÔNICO QUÂNTICO

Nesta seção é apresentado um resumo do conhecido modelo do oscilador harmônico quântico (Eq. C.1):

$$\hat{H} = \frac{\hat{P}^2}{2m} + \frac{m\omega^2}{2}\hat{X}^2 \quad (\text{C.1})$$

Onde \hat{H} é o operador hamiltoniano e representa a energia total do sistema; \hat{P} é o operador momento; m é a massa; ω é a frequência da oscilação; e \hat{X} é o operador posição. Em analogia ao oscilador harmônico clássico, o termo $\frac{\hat{P}^2}{2m}$ está associado à energia cinética, e o termo $\frac{m\omega^2}{2}\hat{X}^2$ à energia potencial. Para simplificar o cálculo, costuma-se criar operadores adimensionais $\underline{\hat{P}}$ e $\underline{\hat{X}}$ em vez de \hat{P} e \hat{X} , respectivamente, fatorando-se os dois termos por $\frac{\hbar\omega}{2}$:

$$\hat{H} = \frac{\hbar\omega}{2} \left(\underline{\hat{P}}^2 + \underline{\hat{X}}^2 \right) \quad (\text{C.2})$$

Onde:

$$\underline{\hat{P}} = \sqrt{\frac{1}{m\hbar\omega}} \hat{P} \quad (\text{C.3})$$

$$\underline{\hat{X}} = \sqrt{\frac{m\omega}{\hbar}} \hat{X} \quad (\text{C.4})$$

Como $i^2 = -1$ e o comutador é $[\hat{X}, \hat{P}] = i\hbar$, a soma de quadrados da Eq. C.2 pode ser reescrita como uma diferença de quadrados como um produto notável:

$$\underline{\hat{X}}^2 + \underline{\hat{P}}^2 = \left(\underline{\hat{X}} + i\underline{\hat{P}} \right) \left(\underline{\hat{X}} - i\underline{\hat{P}} \right) + i \left[\underline{\hat{X}}, \underline{\hat{P}} \right] \quad (\text{C.5})$$

O valor do comutador dos operadores \hat{X} e \hat{P} em \hat{X} e \hat{P} é encontrado pelas equações Eq. C.3 e C.4. Ao substituir $[\hat{X}, \hat{P}]$ por $i\hbar$, temos:

$$[\hat{X}, \hat{P}] = \sqrt{\frac{m\omega}{\hbar}} \sqrt{\frac{1}{m\omega\hbar}} [\hat{X}, \hat{P}] = i \quad (\text{C.6})$$

Assim, a equação C.5 é reescrita como:

$$\hat{X}^2 + \hat{P}^2 = (\hat{X} + i\hat{P})(\hat{X} - i\hat{P}) - 1 \quad (\text{C.7})$$

Ao substituir a soma de quadrados da equação C.2 pelo valor encontrado em C.7, o hamiltoniano do oscilador harmônico quântico torna-se:

$$\hat{H} = \hbar\omega \left[\frac{(\hat{X} + i\hat{P})(\hat{X} - i\hat{P})}{\sqrt{2}} - \frac{1}{2} \right] \quad (\text{C.8})$$

Como \hat{X} e \hat{P} são iguais aos seus conjugados hermitianos, note que $(\hat{X} + i\hat{P})$ é multiplicada por sua conjugada complexa e dois novos operadores podem representar estes termos (Eq. C.9 e C.10):

$$\hat{a} = \frac{(\hat{X} + i\hat{P})}{\sqrt{2}} \quad (\text{C.9})$$

$$\hat{a}^\dagger = \frac{(\hat{X} - i\hat{P})}{\sqrt{2}} \quad (\text{C.10})$$

O hamiltoniano do oscilador harmônico quântico é reescrito simplesmente como (Eq. C.11):

$$\hat{H} = \hbar\omega \left(\hat{a}\hat{a}^\dagger - \frac{1}{2} \right) \quad (\text{C.11})$$

Onde \hat{a} e \hat{a}^\dagger são conhecidos como operadores bosônicos de aniquilação e criação, respectivamente. E o que é criado ou aniquilado são as excitações de um sistema de oscilação harmônica.