



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

JACIARA BÄR

**ORGANIZAÇÃO DE NANOBASTÕES DE OURO EM CANAIS
MICROFABRICADOS: APLICAÇÃO EM ESPECTROSCOPIA RAMAN
INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE**

CAMPINAS

2022

JACIARA BÄR

**ORGANIZAÇÃO DE NANOBASTÕES DE OURO EM CANAIS
MICROFABRICADOS: APLICAÇÃO EM ESPECTROSCOPIA RAMAN
INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Italo Odone Mazali

Coorientador: Dr. Carlos César Bof Bufon

O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Jaciara Bär e orientada pelo Prof. Dr. Italo Odone Mazali.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

B23o Bär, Jaciara, 1991-
Organização de nanobastões de ouro em canais microfabricados : aplicação em espectroscopia Raman intensificada por superfície / Jaciara Bär. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Italo Odone Mazali.
Coorientador: Carlos César Bof Bufon.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Espectroscopia Raman. 2. Nanobastões de ouro. 3. Microfabricação. 4. Sensor. 5. Plasmônica. I. Mazali, Italo Odone, 1972-. II. Bufon, Carlos César Bof, 1976-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Gold nanorods organization in manufactured microchannels : application in surface-enhanced Raman spectroscopy

Palavras-chave em inglês:

Raman spectroscopy

Gold nanorods

Microfabrication

Sensor

Plasmonics

Área de concentração: Química Inorgânica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Italo Odone Mazali [Orientador]

Daniel Grasseschi

Leonardo Negri Furini

Marcia Cristina Breikreitz

Paulo Cesar de Sousa Filho

Data de defesa: 22-07-2022

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1012-2872>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2698404923245839>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Italo Odone Mazali (Orientador)

Prof. Dr. Daniel Grasseschi (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Leonardo Negri Furini (Universidade Federal de Santa Catarina)

Prof.^a Dr.^a Marcia Cristina Breitreitz (Universidade Estadual de Campinas)

Prof. Dr. Paulo Cesar de Sousa Filho (Universidade Estadual de Campinas)

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **Jaciara Bär**, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de julho de 2022.

Dedicada ao meu companheiro
e melhor amigo, Isaías.

Agradecimentos

À Deus, pela vida, amor e proteção ao longo do caminho. Em cada ponto da estrada estou em suas mãos.

Aos meus pais, Arno (*in memoriam*) e Alice, pelo amor e dedicação que me inspiram a buscar ser uma pessoa melhor a cada experiência vivida. Dentro de mim sempre haverá uma parte deles. Agradecimento especial para minha mãe por todo carinho e apoio ao longo da trajetória acadêmica.

Ao Isaías, por ser o melhor companheiro que alguém poderia ter! Por ser tão incrível comigo, me contagiar com sua alegria e ao mesmo tempo me proporcionar calma. Por me apoiar e ajudar em todos os momentos. Por ser chato e crítico. Por ser querido e sensível. Por contemplar comigo música ou outros tipos de obra de arte que tocam na alma. Por ser besta e me fazer rir. Por me aceitar como eu sou. Por ser quem é e estar presente para o que der e vier.

Aos membros da minha família, especialmente aos meus sobrinhos (Rafael, Vinícius e Joaquim) que me trazem muita alegria, meus irmãos (Jonas e Jaime) e cunhadas (Vera e Jessica) pelo apoio de sempre, minha avó (*oma* Selma) pelo carinho e entusiasmo inspirador e aos tios (Egon e Helga) e primos (Marcia, Wladimir, Elisandra e Diogo) mais próximos, que estão sempre torcendo por mim. Agradeço à família do Isaías, que também é minha (Juarez, Eliza, Enise e Victor), por todo apoio, carinho e acolhimento.

Às amigas que fiz durante o doutorado e mestrado e vou levar sempre comigo: Gesiane, Letícia, Fernanda e Isabela. São as melhores que eu tenho hoje e espero manter sempre viva essa amizade. Elas me apoiam nos momentos ruins, me ouvem, me aconselham e me aceitam como eu sou. Aliás, me incentivam a ser eu mesma sem me preocupar com o que os outros vão pensar. Ao mesmo tempo, quando percebem que estou errada elas dão um jeito de me comunicar. Além disso, elas vivenciam e compartilham momentos felizes comigo. Tudo isso é recíproco da minha parte. Os melhores amigos são poucos, mas vou citar mais um. Agradeço ao meu primo Diogo, um dos meus melhores amigos que a vida me deu, por estar presente por vários anos, pelas brincadeiras que me fazem rir e tornam minha vida mais leve. Tenho muitos outros amigos, pessoas queridas que conheci ao longo da vida que

tenho em meu pensamento e mesmo depois de um tempo sem contato, me despertam alegria quando conversamos ou nos encontramos. Sinto um carinho enorme por tanta gente que conheci em São Paulo durante o mestrado e em Campinas durante o doutorado, alguns da igreja que frequento outros da universidade. Recentemente, durante a escrita dessa tese, me mudei para o estado do Paraná e na cidade em que estou conheci mais duas pessoas queridas. Agradeço pelos bons momentos que aliviam a tensão nessa fase da escrita.

Aos professores que tive até o momento, que tem papel fundamental na formação do pensamento crítico e que deveriam ser mais valorizados. Ao professor Oswaldo Luiz Alves (*in memoriam*) por ter me incentivado a ir em busca da melhoria contínua. Nunca saberemos o impacto que podemos causar na vida de alguém, mas sabemos que somos impactados pela vida de outras pessoas, por exemplo, professores e amigos. Um professor (Lauri) do ensino médio que te influencia a seguir tal carreira, uma professora (Flávia) da graduação que faz propaganda da USP quando se está no último ano, uma amiga (Jocasta) que se empolga mais que você e te incentiva a ir junto com ela para São Paulo fazer um mestrado, um professor (Oswaldo Sala, *in memoriam*) da USP que te dá um “sopro” de coragem e esperança em um momento que a insegurança te domina, outro professor (Rômulo) da USP que te inspira na pesquisa científica, um professor (Italo) da Unicamp que você conhece em um congresso de espectroscopia Raman e te passa leveza, posteriormente se torna membro da sua banca do mestrado e por fim é escolhido como orientador do doutorado, por isso:

Ao Prof. Italo, por ter aceitado me orientar. Pelo acolhimento no início do doutorado e sensibilidade nos momentos mais tensos (de fato, a leveza transpareceu e isso foi muito importante para mim). Por me ensinar e motivar no decorrer do caminho do doutorado. Pelas oportunidades de colaborações que me foram dadas. Por ser compreensivo comigo e me ajudar sempre que possível.

À minha colega Anerise, por sua dedicação em também me orientar ao longo do doutorado. Pelas várias reuniões e discussões que ajudaram na compreensão dos dados obtidos nesse trabalho. Por sempre me ajudar, sou muito grata. Sua contribuição foi essencial para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Pesquisador César pela oportunidade de desenvolver parte do meu projeto de doutorado no LNNano do CNPEM. Pela orientação objetiva e bem direcionada em parte do desenvolvimento desse trabalho.

À divisão de caracterização do LNNano pelas medidas de Microscopia eletrônica de varredura (João e Fabiano) e de Microscopia de força atômica (Carlos, Cleyton e Ailton). Ao Davi e Mariane por toda ajuda na sala limpa com os processos de microfabricação e limpeza dos substratos SERS desenvolvidos nesse trabalho.

Ao Leandro e ao Flávio, pelas colaborações realizadas para a publicação do artigo. Pelas discussões e por toda ajuda.

À psicóloga Helena, excelente profissional e pessoa que me ajuda no processo de autoconhecimento e a lidar com o que não pode ser mudado. Pela ajuda na construção de maior confiança, fundamental para a concretização desse trabalho.

Aos meus colegas do LMF e ao Prof. Fernando, pela ótima convivência, pelas discussões em seminários de grupo e pelo auxílio nas práticas experimentais no começo do doutorado, em especial à Naiara que além de me ajudar na bancada, me acolheu em sua casa até eu encontrar um lugar para morar. Também aos meus colegas do LNNano pela ótima convivência, discussões e ajuda.

Aos funcionários e técnicos do Instituto de Química da Unicamp que contribuíram para a realização desse trabalho. Em especial à Milene, por todo apoio e auxílio nas medidas de espectroscopia Raman realizadas no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia Óptica Avançada (LMEOA).

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliar esse trabalho e pelas valiosas contribuições.

Ao Instituto de Química, à Universidade Estadual de Campinas e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa concedida durante o período do doutorado. Agradeço especialmente pelo período de 6 meses de prorrogação devido à pandemia.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.”

“O caminho para o progresso não é rápido nem fácil.”

Marie Curie

“Para pequenas criaturas como nós, a imensidão é suportável apenas através do amor.”

Carl Sagan, **Cosmos**

Mas renova-se a esperança

Nova aurora a cada dia

E há que se cuidar do broto

Pra que a vida nos dê

Flor, flor e fruto!

Milton Nascimento, *Coração de Estudante*

Você verá que é mesmo assim

Que a história não tem fim

Continua sempre que você responde “sim”

À sua imaginação

À arte de sorrir

Cada vez que o mundo

Diz “não”

Você verá

Que a emoção começa agora

Agora é brincar de viver

Não esquecer

Ninguém é o centro do universo

Assim é maior o prazer.

Guilherme Arantes, *Brincar de Viver*

“Liberdade de voar num horizonte qualquer,
liberdade de pousar onde o coração quiser.”

Cecília Meireles

RESUMO

Por apresentarem baixas intensidades, estratégias de intensificação dos espectros Raman são de grande interesse, uma vez que eles fornecem uma “impressão digital” de moléculas. Uma das estratégias para superar essa característica é o espalhamento Raman intensificado por superfície com o emprego de metais, o que possibilita a identificação de compostos em concentrações muito baixas. No entanto, ainda é um desafio obter substratos que contemplem tanto elevada sensibilidade quanto a reprodutibilidade de intensidade dos espectros. Nesse trabalho, microcanais em forma de V foram fabricados em silício (100) como estratégia para organizar nanobastões de ouro e produzir substratos com alta sensibilidade e reprodutibilidade de intensidade. A caracterização dos microcanais foi realizada por meio de microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia Raman. A largura no fundo dos microcanais foi comparável com a largura média dos nanobastões de ouro obtidos na síntese. A deposição dos nanobastões foi realizada pelo método de gotejamento com o substrato inclinado a 5° em relação à horizontal. Essas condições favoreceram a organização ponta a ponta em regiões do centro do substrato, bem como a formação de estruturas tridimensionais em regiões de extremidade dos microcanais. Um efeito de intensificação gerado pelo próprio microcanal em forma de V foi observado por meio da espectroscopia Raman, na ausência de nanobastões de ouro, sendo denominado de espalhamento Raman intensificado induzido pela forma. Um aumento de intensidade de duas vezes foi observado para a banda em 521 cm⁻¹ do silício na região dentro dos microcanais em comparação com a banda na região sem microcanais. Simulações por elementos finitos corroboraram esse resultado, sugerindo que padrões de interferências construtivas da propagação do campo elétrico espalhado são gerados tanto dentro dos microcanais quanto nas suas vizinhanças, sendo que na borda dos microcanais essas interferências construtivas são mais intensas. A combinação de microcanais em forma de V e estruturas tridimensionais de nanobastões de ouro resultou em substratos de espalhamento Raman intensificado por superfície altamente sensíveis, alcançando detecções de rodamina 6G na ordem de attomolar (10⁻¹⁸ mol L⁻¹). A projeção multivariada dos espectros mostrou que as concentrações de 10⁻⁶ e 10⁻⁸ mol L⁻¹ em substratos de silício sem microcanais são

aproximadamente equivalentes às respostas de 10^{-10} e 10^{-11} mol L⁻¹ em substratos de silício com microcanais, o que indica maior sensibilidade nos substratos com microcanais. Adicionalmente, os substratos desenvolvidos foram testados também para o fungicida Tiram, alcançando-se detecções de até 10^{-10} mol L⁻¹. Foi observado que as regiões que correspondem ao microcanal em forma de V também apresentam maior sensibilidade para o Tiram quando comparadas às regiões sem microcanais. Além disso, foi observada maior resposta para os espectros obtidos dentro dos microcanais em comparação com os obtidos na borda dos microcanais. Esse resultado foi atribuído às estruturas tridimensionais de nanobastões de ouro presentes apenas dentro dos microcanais. A contribuição simultânea do espalhamento Raman intensificado por superfície e espalhamento Raman intensificado induzido pela forma foi responsável pela alta sensibilidade dos substratos desenvolvidos, possibilitando detecções em concentrações muito baixas, tais como a detecção de uma única molécula.

ABSTRACT

Due to their low intensities, strategies to enhance the Raman spectra intensity are of great interest, since they provide a “fingerprint” of molecules. One strategy to overcome this characteristic is surface-enhanced Raman scattering using metals, making possible the identification of compounds at very low concentrations. However, it is still a challenge to obtain substrates that contemplate both high sensitivity and spectra intensity reproducibility. In this work, V-shaped microchannels were fabricated in silicon (100) as a strategy to assemble gold nanorods and produce substrates with high sensitivity and intensity reproducibility. The microchannels characterization was performed by atomic force microscopy, scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. The microchannels bottom size was comparable to the synthesized gold nanorods average width. The nanorods deposition was performed by the drop method with the substrate tilted at 5° in relation to the horizontal. These conditions favored the end-to-end assemble in substrate center regions, as well as the formation of three-dimensional structures in the microchannels end regions. In the absence of gold nanorods, an intensification effect generated by the V-shaped microchannel itself was observed by Raman spectroscopy, being called shape-induced enhanced Raman scattering. A twofold increase in intensity was observed for the silicon band at 521 cm^{-1} in the region within the microchannels when compared to the band in the region without microchannels. Finite element simulations corroborated this result, suggesting that constructive interference patterns from the scattered electric field propagation are generated both within the microchannels and in their neighborhoods, and at the microchannels edge these constructive interferences are more intense. The V-shaped microchannels combination with gold nanorods three-dimensional structures resulted in highly sensitive surface-enhanced Raman scattering substrates, reaching rhodamine 6G detections in the attomolar order (10^{-18} mol L^{-1}). Multivariate projection of the spectra showed that 10^{-6} and 10^{-8} mol L^{-1} concentrations in silicon substrates without microchannels are approximately equivalent to responses of 10^{-10} and 10^{-11} mol L^{-1} in silicon substrates with microchannels, indicating greater sensitivity in substrates with microchannels. Additionally, the developed substrates were also tested for the fungicide Thiram, reaching detections of up to 10^{-10} mol L^{-1} . It was observed that the V-shaped microchannel regions also show greater sensitivity to Thiram when

compared to the regions without microchannels. In addition, a greater response was observed for the spectra obtained within the microchannels when compared to those obtained at the microchannels edge. This result was attributed to the gold nanorods three-dimensional structures only present within the microchannels. The simultaneous contribution of surface-enhanced Raman scattering, and shape-induced Raman scattering was responsible for the developed substrates high sensitivity, enabling detections at very low concentrations, such as single-molecule detection.

Lista de Ilustrações

- Figura 1.** Ilustração dos espalhamentos de radiação inelástico (a; c) e elástico (b). 26
- Figura 2.** Comparação dos ramos Stokes e anti-Stokes do espectro Raman de crocoíta, usando laser com comprimento de onda de 514,5 nm (19435 cm^{-1}). As bandas Raman nos ramos Stokes e anti-Stokes do espectro têm os mesmos valores de deslocamento Raman (números de onda relativos, com deslocamento Raman de 0 cm^{-1} definido como o espalhamento Rayleigh). Para mostrar a relação entre números de onda absolutos e relativos, frequências e comprimentos de onda, o eixo das abscissas é representado com três escalas adicionais na parte superior da figura. Adaptada de Nasdala *et al.*¹⁵29
- Figura 3.** Representação das transições de transferência de carga (seta vermelha) no conjunto molécula-metal e da transição eletrônica entre os níveis moleculares (seta azul). Adaptada de Lombardi e Birke.^{37,38}32
- Figura 4.** Ilustração esquemática da oscilação dos elétrons em uma nanoesfera (aproximação quase estática).34
- Figura 5.** Representação do espalhamento Raman para a molécula R6G em condições de Raman convencional, SERS e *hot spot*, no qual E representa o campo elétrico da radiação incidente. Adaptada de Godoy.⁴³35
- Figura 6.** Esboço representando (I) uma gota contendo AgNPs em uma superfície hidrofóbica, (II) partículas distribuídas em um espaço 3D formado no processo de evaporação da água, e (III) a agregação e deposição de AgNPs no substrato antes da deposição de analito, o que não resulta em uma matriz de *hot spot* 3D. Adaptada de Liu *et al.*⁶⁷36
- Figura 7.** (a) Espectro de extinção simulado que descreve a comparação direta entre correntes retas (azul) e desordenadas (vermelho) de AuNRs organizados ponta a ponta com separação de 1 nm. Figura adaptada de Jones *et al.*⁶⁵. (b) Comparação da intensidade SERS experimental para estruturas de AuNRs organizados lado a lado e desorganizadas. (c) Exemplos de perfis de intensidade de campo elétrico produzidos via simulação para a organização lado a lado de nanobastões. (d) Ilustração esquemática de AuNRs organizados lado a lado mostrando uma redução do campo elétrico devido à interferência destrutiva. Adaptada de Lee *et al.*⁷².....38

Figura 8. Ilustração esquemática de AuNRs depositados em um substrato com espelho de Au e grade dielétrica. Adaptada de Wu <i>et al.</i> ⁷⁹	39
Figura 9. Ilustração dos objetivos propostos no presente trabalho.....	41
Figura 10. Ilustração esquemática dos processos de microfabricação para obtenção de microcanais em forma de V em substrato de Si (100). Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸ ...	44
Figura 11. Máscara virtual utilizada no processo de fotolitografia. Os quadrados servem como referência para o processo de corrosão RIE realizado logo após ao processo de fotolitografia. Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	45
Figura 12. Ilustração do processo de corrosão anisotrópica úmida do Si (100) em solução de KOH. O suporte de amostra permitiu a imobilização do Si durante o processo de corrosão.....	47
Figura 13. Ilustração do processo de síntese de AuNRs mediado por sementes. ...	48
Figura 14. Ilustração da (a) deposição por gotejamento da suspensão coloidal de AuNRs no substrato inclinado, e (b) moléculas de R6G adsorvidas em nanoestruturas de AuNRs no substrato com microcanais em forma de V. Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸ ..	49
Figura 15. Geometria e malha para simulação por elementos finitos. (a) Geometria de amostra considerada para a simulação. (b) Configuração da malha empregada nos subdomínios de simulação. (c) Vista detalhada da configuração da malha do substrato de Si plano. (d) Visão detalhada da configuração da malha na região do canal em forma de V. (e) Visão detalhada do canal em forma de V. As dimensões do objeto são mostradas nas imagens (a) e (e). Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	52
Figura 16. Imagens confocais tridimensionais e bidimensionais adquiridas durante o monitoramento do processo AWE. (a, b) Antes do processo AWE; (c, d) Após 2 min do processo AWE; (e, f) Após 4 min do processo AWE. Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	56
Figura 17. Imagem de (a) AFM e (b) SEM para um microcanal em forma de V de um substrato fabricado nesse trabalho.	57
Figura 18. (a-d) Microscopia SEM para substratos de Si com microcanais em forma de V em diferentes ampliações após o processo de limpeza para a sua reutilização. Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	59

- Figura 19.** Média e desvio padrão para 20 espectros Raman do Si em cada substrato (com e sem microcanais em forma de V) monitorados pela banda referente ao modo LO em 521 cm^{-1} . Adaptada de Bär *et al.*⁸.....60
- Figura 20.** Espectros Raman para substrato com microcanal em forma de V em diferentes regiões monitoradas pela banda LO do Si em 521 cm^{-1} , usando laser de comprimento de onda de 633 nm, com tempo de exposição de 10 s e 1 acc. Adaptada de Bär *et al.*⁸.....60
- Figura 21.** (a) Espectros Raman médios e desvios padrão da solução $10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ de R6G nos substratos com (espectro vermelho) e sem (espectro azul) microcanais em forma de V. (b, c) Conjunto de 100 espectros Raman da R6G adquiridos para os substratos com e sem microcanais em forma de V. Todas as análises foram realizadas com laser de 633 nm, tempo de exposição de 1 s e 1 acc. Adaptada de Bär *et al.*⁸.61
- Figura 22.** Simulação por elementos finitos do campo elétrico espalhado pelos substratos e intensidade de espalhamento Raman nos substratos (a) Seção transversal da estrutura da amostra usada na simulação. (b) Campo elétrico espalhado normalizado (componente z) ao longo das linhas de perfil 1-7 da imagem (a). Campo elétrico (normalizado pela intensidade do campo elétrico de entrada) espalhado pelo (c) substrato sem microcanais e (d) substrato com microcanais em forma de V. Adaptada de Bär *et al.*⁸.....62
- Figura 23.** Espectro de extinção em função do comprimento de onda para suspensão coloidal de AuNRs obtido em um equipamento de espectroscopia de absorção UV-vis-NIR. Adaptada de Bär *et al.*⁸.....64
- Figura 24.** Imagens de TEM dos AuNRs e gráfico de distribuição de tamanho de partícula. Adaptada de Bär *et al.*⁸.....65
- Figura 25.** Imagens de SEM para substratos SERS sem microcanais em diferentes regiões. (a-d) AuNRs organizados lado a lado, (e) agregados 3D de AuNRs e (f) algumas organizações de AuNRs lado a lado tanto na posição vertical quanto horizontal. Adaptada de Bär *et al.*⁸.....67
- Figura 26.** Imagens de SEM para substratos com microcanais em forma de V na presença de AuNRs em diferentes regiões. (a-c) AuNRs organizados ponta a ponta no fundo do microcanal (centro do substrato), (d) AuNRs organizados lado a lado nas

paredes e no fundo do canal (lateral do substrato na altura do quadrado de referência) e (e, f) agregados 3D de AuNRs (extremidades dos microcanais).....	68
Figura 27. Imagens de SEM de AuNRs em substratos SERS com (a, b) microcanais e sem (c, d) microcanais. Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	69
Figura 28. Conjunto de 100 espectros SERS da R6G em diferentes concentrações para substratos SERS sem microcanais. (a) 10^{-6} mol L ⁻¹ , (b) 10^{-8} mol L ⁻¹ , e (c) 10^{-10} mol L ⁻¹ . Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	71
Figura 29. Conjuntos de 100 espectros SERS da R6G em diferentes concentrações, para substratos SERS com microcanais em forma de V. (a) 10^{-6} mol L ⁻¹ , (b) 10^{-8} mol L ⁻¹ , (c) 10^{-10} mol L ⁻¹ , (d) 10^{-12} mol L ⁻¹ , (e) 10^{-14} mol L ⁻¹ , (f) 10^{-16} mol L ⁻¹ , e (g) 10^{-18} mol L ⁻¹ . Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	72
Figura 30. Espectros SERS médios em diferentes concentrações de R6G nos substratos SERS com (a) e sem microcanais em forma de V (b). A linha de sombreamento corresponde ao desvio padrão obtido para o conjunto de 100 espectros coletados. Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	75
Figura 31. Gráficos de coordenadas paralelas de a) dados brutos e b) dados EMSC. c) Valores dos coeficientes de silhueta calculados para todas as projeções <i>Classical Scaling</i> (CS), <i>Sammon's Mapping</i> (SM), <i>Interactive Document Map</i> (IDMAP) e <i>Least Square Projection</i> (LSP). Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	77
Figura 32. Gráfico IDMAP dos espectros Raman (1100 - 1700 cm ⁻¹) para as diferentes concentrações de solução de R6G (10^{-6} - 10^{-18} mol L ⁻¹). Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	78
Figura 33. <i>Classical Scaling Plots</i> de espectros Raman (1100 - 1700 cm ⁻¹) corrigidos da R6G em diferentes concentrações para (c) substratos SERS com e (d) sem microcanais em forma de V. A barra preta é apenas um guia para medir as distâncias entre os pontos dos dados. Todas as análises foram realizadas em diferentes substratos, usando um laser de 633 nm com tempo de exposição de 20 s e com 1 acc.	78
Figura 34. Comparação entre a sensibilidade dos substratos SERS com e sem microcanais do gráfico de <i>Classical Scalin</i> de espectros Raman (1100 - 1700 cm ⁻¹) para diferentes concentrações (10^{-6} - 10^{-18} mol L ⁻¹) de R6G. Adaptada de Bär <i>et al.</i> ⁸	79

Figura 35. Comparação entre os espectros Raman (Tiram na forma de pó) e SERS (concentração: 10^{-10} mol L ⁻¹) do Tiram usando <i>laser</i> com comprimento de onda de 633 nm com 10 s de exposição e 1 acc. O espectro SERS foi obtido dentro de um microcanal em forma de V, próximo à uma região de <i>coffee ring</i> , onde se encontram várias estruturas 3D de AuNRs.	81
Figura 36. Formas de adsorção do Tiram em uma superfície de Au. Adaptada de Sánchez-Cortés <i>et al.</i> ¹²¹	84
Figura 37. Conjuntos de 100 espectros SERS do Tiram na concentração 10^{-7} mol L ⁻¹ em regiões de borda dos microcanais (a, b), dentro dos microcanais (c, d) e fora dos microcanais (e, f).....	86
Figura 38. Conjunto de 50 espectros SERS do Tiram na concentração 10^{-7} mol L ⁻¹ em uma região sem microcanal próximo à borda da gota de AuNRs (<i>coffee ring</i>).	88
Figura 39. <i>Classical scaling</i> [(coeficiente de silhueta: 0.74). Mapa 2D referente aos espectros em diferentes regiões do substrato SERS na concentração de 10^{-7} mol L ⁻¹ de Tiram. Elaborada por Flávio Makoto Shimizu.	89
Figura 40. Conjuntos de 100 espectros SERS do Tiram nas concentrações de solução de 10^{-8} mol L ⁻¹ (a, b) 10^{-9} mol L ⁻¹ (c, d) e 10^{-10} mol L ⁻¹ (e, f) em regiões de borda dos microcanais (a, c, e) e dentro dos microcanais (b, d, f).....	90
Figura 41. Média e desvio padrão para os conjuntos de 100 espectros SERS nas concentrações de solução de Tiram de 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} mol L ⁻¹ nas regiões de borda dos microcanais em forma de V (a) e nas regiões dentro dos microcanais em forma de V (b). <i>Classical Scaling</i> : Coeficiente de silhueta 0,73 para as regiões de borda dos microcanais (c) e 0,93 para as regiões dentro dos microcanais em forma de V (d). Figuras c) e d) elaboradas por Flávio Makoto Shimizu.....	92
Figura 42. <i>Classical Scaling</i> : Coeficiente de silhueta 0,70. Com discriminação entre os dados referentes às regiões de borda (b, sombra vermelha) e dentro (d, sombra azul) dos microcanais em forma de V. Inclui os agrupamentos referentes às regiões fora dos microcanais (e, correspondente à uma região entre canais) e [l, correspondente à uma região longe dos microcanais, próximo a borda da gota (<i>coffee ring</i>) de AuNRs]. Elaborada por Flávio Makoto Shimizu	93

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros de exposição do processo de fotolitografia.....	45
Tabela 2. Parâmetros do processo de corrosão RIE.	46
Tabela 3. Atribuição de bandas da R6G observadas nos espectros SERS. ¹⁰⁰⁻¹⁰² ...	73
Tabela 4. Atribuição de bandas do Tiram observadas nos espectros Raman e SERS. ¹²⁰	83
Tabela 5. Comparação entre o limite de detecção obtido nesse trabalho com os limites de detecção encontrados na literatura para o Tiram.	95

Lista de Abreviaturas e Siglas

3D.....	Tridimensionais
acc.....	Acumulação
AFM.....	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AgNPs	<i>Silver Nanoparticles</i>
AuNPs	<i>Gold Nanoparticles</i>
AuNRs	<i>Gold Nanorods</i>
AWE	<i>Anisotropic Wet Etching</i>
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CS	<i>Classical Scaling</i>
CTAB.....	<i>Cetyltrimethylammonium Bromide</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DLP	<i>Digital Light Processor</i>
EM.....	Eletromagnético
EMSC.....	<i>Extended Multiplicative Scatters Correction</i>
FDTD.....	<i>Finite-Difference Time-Domain</i>
HMDS.....	1,1,1,3,3,3-hexametildissilazano
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
IDMAP	<i>Interactive Document Mapping</i>
IQ-UNICAMP	Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas
LMF	Laboratório de Materiais Funcionais
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
LO	Longitudinal óptico
LSCM	<i>Laser Scanning Confocal Microscopy</i>
LSP	<i>Least Square Projection</i>
LSPR.....	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
LUMO.....	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
NPs	Nanopartículas
P.A.	Para análise
PEB	<i>Post-Exposure Bake</i>
R6G.....	Rodamina 6G
RIE	<i>Reactive Ion Etching</i>

SEM *Scanning Electron Microscopy*
SERS *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*
SIERS *Shape-Induced Enhanced Raman Scattering*
SM *Sammon's Mapping*
SPPR *Surface Plasmon Polariton Resonance*
SPs *Surface Plasmons*
TEM *Transmission Electron Microscopy*
u. a. *Unidade arbitrária*
UV *Ultravioleta*
UV-vis-NIR *Ultraviolet-Visibly-Near-Infrared*
VLSI *Very Large Scale Integration*

Lista de Símbolos

S	Coeficiente de Silhueta médio
k	Constante de Boltzmann
q	Coordenada interna
e_v	Diferença entre os níveis de energia fundamental e excitado
ν_0	Frequência da radiação incidente
ν_v	Frequência vibracional
I_A	Intensidade anti-Stokes
I_S	Intensidade Stokes
δ	Modo vibracional de deformação angular
v	Modo vibracional de estiramento
ν_s	Modo vibracional de estiramento simétrico
ν_{as}	Modo vibracional de estiramento antissimétrico
μ	Momento de dipolo elétrico
α	Polarizabilidade
T	Temperatura
\vec{E}	Vetor campo elétrico
\vec{P}	Vetor momento de dipolo induzido

SUMÁRIO

1	Contextualização	25
2	Introdução	26
2.1	Espectroscopia Raman	26
2.2	Espalhamento Raman intensificado por superfície	30
2.2.1	Mecanismo químico de intensificação	32
2.2.2	Mecanismo eletromagnético de intensificação	33
2.2.3	Substratos SERS	35
2.3	Espalhamento Raman em superfícies com cavidades.....	40
3	Objetivos.....	41
4	Parte experimental	42
4.1	Materiais	42
4.2	Instrumentação	42
4.3	Procedimentos	43
4.3.1	Microfabricação de canais	43
4.3.2	Síntese de AuNRs	47
4.3.3	Fabricação de substratos SERS.....	48
4.3.4	Espectroscopia Raman.....	50
4.3.5	Simulação de campo elétrico espalhado	51
4.3.6	Visualização de informação	53
5	Resultados e discussões.....	55
5.1	Caracterização dos microcanais em Si (100).....	55
5.2	Espalhamento Raman em Si com e sem microcanais	59
5.3	Caracterização dos AuNRs.....	64
5.4	Caracterização dos substratos SERS	66
5.5	Substratos SERS com e sem microcanais.....	70
5.6	Aplicação dos substratos SERS com microcanais na detecção de Tiram	80
6.	Conclusões.....	96
7.	Perspectivas.....	98
	Referências	99

*E ali logo em frente
 A esperar pela gente o futuro está
 E o futuro é uma astronave
 Que tentamos pilotar
 Não tem tempo, nem piedade
 Nem tem hora de chegar
 Sem pedir licença, muda a nossa vida
 E depois convida a rir ou chorar
 Nessa estrada não nos cabe
 Conhecer ou ver o que virá
 O fim dela, ninguém sabe
 Bem ao certo onde vai dar
 Vamos todos numa linda passarela de uma aquarela
 Que um dia enfim (descolorirá)*

Toquinho, Aquarela

*Pode um sonho acabar
 Pode uma vida começar
 Pode uma estrela brilhar
 Como pode ser? Num dia a gente está
 E no outro...
 ...também
 Mas onde será? Pode ser aqui, pode ser aí
 Ou na lembrança de alguém
 Que nos quer tão bem, que nos quer tão bem!
 Nuuuunca deixe de sentir
 Mas tente sorrir, mesmo que não dê, que não dê, que não dê...
 Nuuuunca deixe de sentir
 Mas tente sorrir, mesmo que não dê, que não dê, que não dê...
 Não desista de si!
 Não desista de sii!
 Não desistaaa de si!!!
 Canção sobre a vida*

1 Contextualização

A espectroscopia Raman se baseia no fenômeno de espalhamento inelástico de radiação e, por se tratar de uma espectroscopia vibracional, fornece um espectro característico para cada molécula, comumente conhecido como “impressão digital”.¹ Sendo assim, a principal aplicação dessa técnica se dá na identificação de compostos.

Por sua vez, identificar compostos em concentrações muito baixas é algo relevante em inúmeras aplicações, como: a possibilidade de um diagnóstico precoce, possibilitando um tratamento no estágio inicial de determinada doença;^{2,3} o monitoramento ambiental de pesticidas, que pode evitar o consumo de alimentos contaminados;⁴⁻⁷ exames *antidoping*, evitando fraudes esportivas.⁵ Nesse sentido, o espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS, da sigla em inglês para *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) tem sido bastante investigado para a identificação de compostos em concentrações muito baixas.

Na literatura científica é possível encontrar diferentes estratégias para obtenção de sensores baseados em SERS. No entanto, obter substratos SERS (sensores baseados em SERS) que contemplem tanto a sensibilidade quanto a reprodutibilidade de intensidade dos espectros ainda é um desafio, principalmente quando são usados coloides de nanopartículas (NPs) metálicas. Nesse contexto, a deposição de NPs metálicas em substratos previamente preparados por meio de processos de microfabricação pode auxiliar na organização dessas NPs.

Nesse trabalho, um sensor SERS foi desenvolvido a partir de processos de microfabricação para a obtenção de canais em substratos de silício (Si), onde nanobastões de ouro (AuNRs, da sigla em inglês para *Gold Nanorods*) foram depositados. Paralelamente, outro efeito de intensificação foi observado e investigado, sendo correlacionado ao formato dos microcanais. Parte dos resultados desse trabalho foram publicados na revista científica *ACS Applied Materials & Interfaces*.⁸

2 Introdução

2.1 Espectroscopia Raman

O espalhamento Raman, no qual se baseia a espectroscopia de mesmo nome, se origina a partir da interação entre o campo elétrico de uma radiação eletromagnética (usualmente na região do visível) e a matéria, por meio do fenômeno de espalhamento inelástico da radiação, observado pela primeira vez em líquidos por Chandrasekhara V. Raman em 1928.⁹ Quando uma radiação incide na matéria, a maior parte da radiação que é espalhada se dá na forma elástica, fenômeno denominado de espalhamento Rayleigh. Apenas uma pequena fração da radiação se espalha de forma inelástica, fenômeno conhecido como espalhamento Raman.¹⁰ A Figura 1 ilustra esses fenômenos.

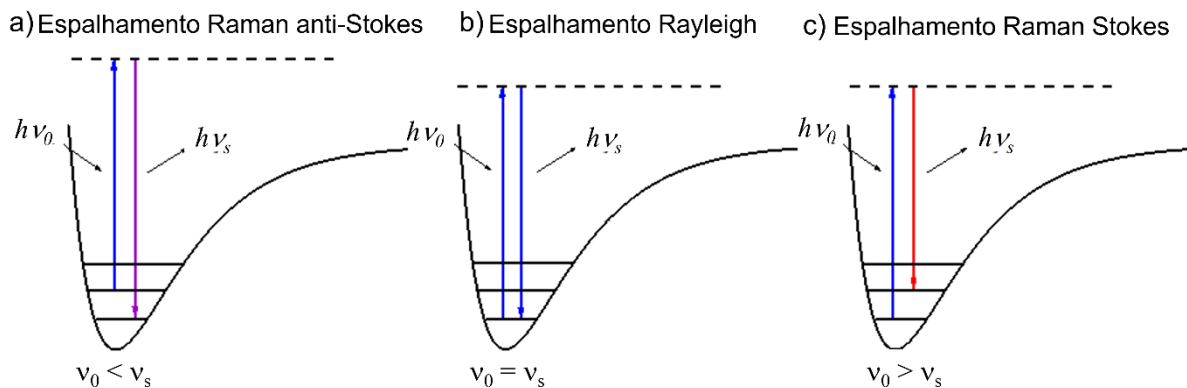


Figura 1. Ilustração dos espalhamentos de radiação inelástico (a; c) e elástico (b).

Com a incidência de uma radiação monocromática de energia $h\nu_0$ em uma molécula, os níveis vibracionais são perturbados, de forma que a molécula é excitada para um estado intermediário entre o estado eletrônico fundamental e o primeiro estado eletrônico excitado (linha tracejada na Figura 1). Conhecido como estado virtual por não corresponder a um autoestado da molécula, mas sim um autoestado do sistema molécula + radiação, a relaxação a partir desse estado se dá para um nível vibracional do estado eletrônico fundamental. Quando a energia da radiação espalhada é maior que a energia da radiação incidente, ocorre o fenômeno de espalhamento Raman anti-Stokes [Figura 1 (a)], caso em que a molécula já está em um nível vibracional excitado e retorna para o nível vibracional fundamental. Quando

a energia da radiação espalhada é menor comparada à energia da radiação incidente, ocorre o fenômeno de espalhamento Raman Stokes [Figura 1(c)].¹¹

Embora as informações que os espectros Raman fornecem sobre a estrutura molecular sejam acerca dos níveis vibracionais assim como na espectroscopia de infravermelho, os fenômenos envolvidos são diferentes para os dois casos. Enquanto na espectroscopia Raman o fenômeno é de espalhamento, na espectroscopia de infravermelho o fenômeno é de absorção. Devido à essa diferença, dependendo da molécula, nem todos os modos vibracionais são ativos no Raman e infravermelho simultaneamente. Para moléculas com um centro de simetria, como o CO₂, os modos vibracionais ativos no Raman não são ativos no infravermelho e vice-versa. Em casos de moléculas sem centro de simetria, como o SO₂, as bandas referentes aos 3N-6 graus de liberdade vibracionais podem ser observadas tanto no Raman quanto no infravermelho. Entretanto, as intensidades das bandas são diferentes pois os dois fenômenos envolvem probabilidades de transições diferentes. Isso mostra que essas duas espectroscopias vibracionais são complementares, pois cada uma possui regras de seleção específicas.¹²

A regra de seleção geral na espectroscopia vibracional, considerando o modelo do oscilador harmônico, descreve que valores de $\Delta v = \pm 1$ são necessários para que uma transição seja permitida. Para um sistema real, a anarmonicidade está presente, resultando em uma mudança nas regras de seleção, de modo que transições com valores de $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$, ocorram. Por isso que bandas harmônicas, que possuem aproximadamente o dobro, triplo, ..., da frequência fundamental, podem ser observadas em um espectro vibracional. Por apresentarem baixa intensidade, elas geralmente são observadas em espectros que apresentem algum tipo de intensificação, como é o caso do Raman ressonante.¹¹

Em relação às regras de seleção específicas nas espectroscopias Raman e infravermelho, para um determinado modo vibracional de uma molécula ser ativo no Raman é necessário que ocorra variação do momento de dipolo induzido (\vec{P}) na molécula pelo campo elétrico (\vec{E}) da radiação incidente e, para ser ativo no infravermelho, é necessário que ocorra variação do momento de dipolo elétrico (μ) das ligações com a vibração.^{11,12}

No espalhamento Raman de moléculas, a resposta dos elétrons excitados pela radiação incidente se manifesta por meio da polarizabilidade eletrônica (α). Essa

polarizabilidade pode ser considerada como uma medida da facilidade de distorção da nuvem eletrônica na presença de um campo elétrico, promovendo um momento de dipolo instantâneo na molécula. Considerando a teoria clássica para o espalhamento Rayleigh e Raman, o vetor momento de dipolo induzido está relacionado com a polarizabilidade da molécula e com o vetor campo elétrico da radiação incidente, por meio da equação: $\vec{P} = \alpha \vec{E}$. O vetor momento de dipolo oscila com sobreposição das frequências da radiação incidente (ν_0) e das vibrações moleculares (ν_v). Considerando uma molécula diatômica, há três componentes do momento de dipolo induzido:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \}$$

O primeiro termo contém somente a frequência da radiação incidente e corresponde ao espalhamento Rayleigh (Figura 1). No segundo termo são levadas em conta radiações espalhadas com frequência $\nu_0 + \nu_v$ (espalhamento Raman anti-Stokes) e $\nu_0 - \nu_v$ (espalhamento Raman Stokes). Para o segundo termo ter contribuição é necessário que $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 \neq 0$, ou seja, deve haver variação da polarizabilidade com o pequeno deslocamento da coordenada q (coordenada interna, única coordenada normal para uma molécula diatômica) em torno da posição de equilíbrio.¹¹

Um espectro Raman é usualmente relatado como a intensidade em função de uma grandeza denominada deslocamento Raman, medida em cm^{-1} . O deslocamento Raman corresponde à diferença entre a energia da radiação espalhada e a energia da radiação incidente, e fornece informação sobre as frequências vibracionais de ligações presentes em moléculas de determinada amostra. Por convenção, os deslocamentos Raman com valores positivos são referentes ao ramo Stokes do espectro e os com valores negativos são referentes ao ramo anti-Stokes do espectro. A intensidade de um espectro Raman depende de alguns fatores como: da frequência da radiação incidente e da espalhada; intensidade da radiação incidente; número de espalhadores; e da variação na polarizabilidade com os modos vibracionais da molécula.^{13,14} A intensidade está relacionada com a quantidade de fótons espalhados com uma determinada energia. Em um espectro Raman, a detecção do espalhamento

Rayleigh é definida como zero. A Figura 2 ilustra os ramos Stokes e anti-Stokes e o espalhamento Rayleigh para o mineral crocoíta (cromato de chumbo PbCrO_4).

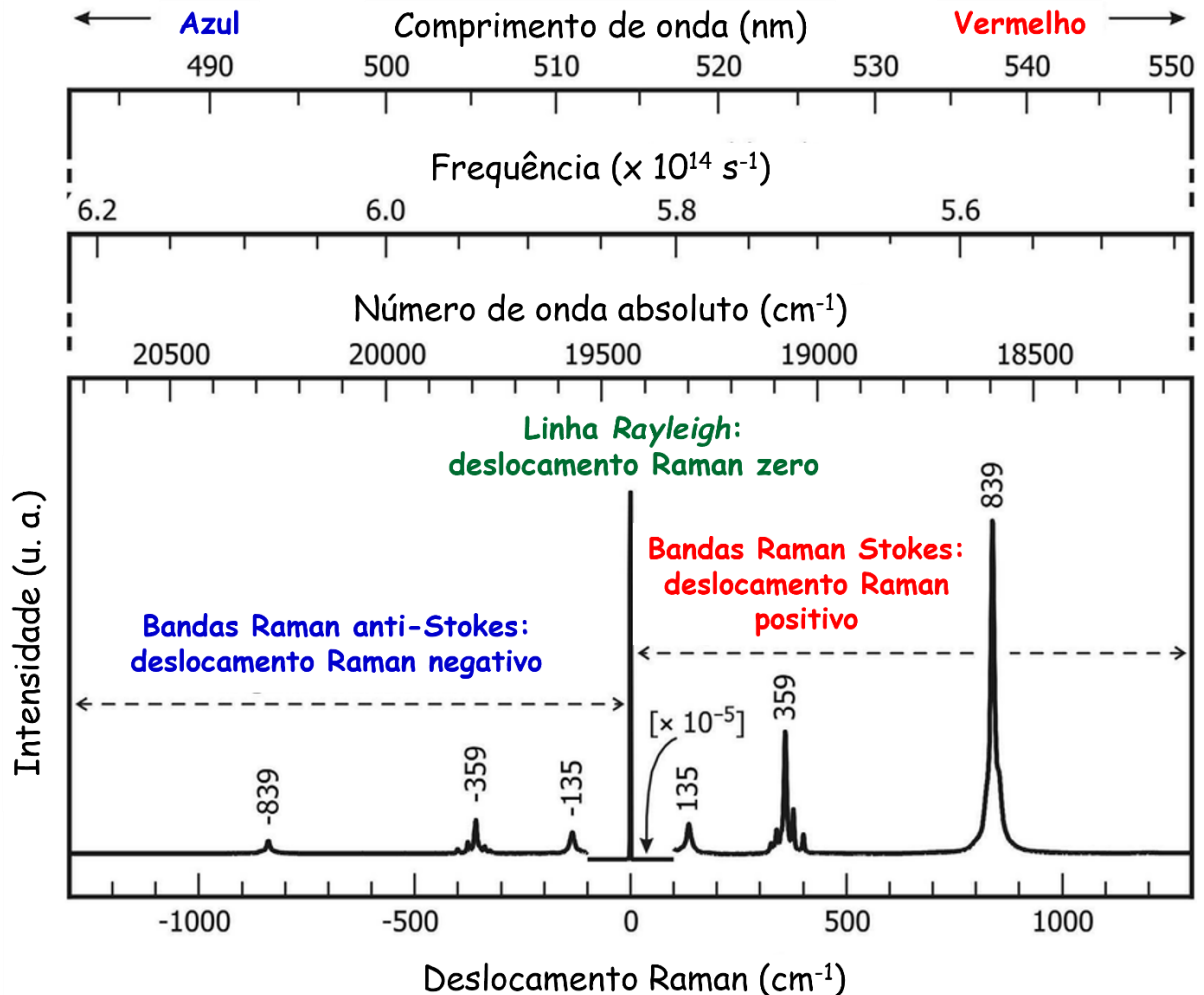


Figura 2. Comparação dos ramos Stokes e anti-Stokes do espectro Raman de crocoíta, usando laser com comprimento de onda de 514,5 nm (19435 cm^{-1}). As bandas Raman nos ramos Stokes e anti-Stokes do espectro têm os mesmos valores de deslocamento Raman (números de onda relativos, com deslocamento Raman de 0 cm^{-1} definido como o espalhamento Rayleigh). Para mostrar a relação entre números de onda absolutos e relativos, frequências e comprimentos de onda, o eixo das abscissas é representado com três escalas adicionais na parte superior da figura. Adaptada de Nasdala *et al.*¹⁵

Como pode ser observado, as bandas do espectro Raman no ramo Stokes são mais intensas comparado ao ramo anti-Stokes. Isso ocorre devido à população dos níveis vibracionais seguir a distribuição de Boltzmann¹⁶, conforme mostra a equação da razão entre as intensidades Stokes e anti-Stokes:¹¹

$$\frac{I_A}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v} \right)^4 e^{-\frac{e\nu}{kT}} \quad \text{onde,}$$

- I_A = intensidade da banda anti-Stokes;
- I_S = intensidade da banda Stokes;
- $\nu_0 + \nu_v$ = frequência da radiação espalhada (anti-Stokes)
- $\nu_0 - \nu_v$ = frequência da radiação espalhada (Stokes)
- e_v = diferença entre os níveis energéticos fundamental e excitado
- k = constante de Boltzmann = $1,3806488 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$
- T = temperatura

Em temperaturas usuais, na maioria das moléculas o nível vibracional excitado não está populado. Conseqüentemente, a maior parte da radiação que é espalhada de forma inelástica corresponde às bandas Raman Stokes. Por esse motivo, e sabendo que as bandas nos ramos Stokes e anti-Stokes apresentam os mesmos valores de deslocamento Raman, usualmente os espectros Raman são obtidos e analisados somente no ramo Stokes.¹⁵ A obtenção dos espectros nos ramos Stokes e anti-Stokes depende também do tipo de filtro óptico utilizado no equipamento para rejeição do espalhamento Rayleigh. Filtros *notch* permitem a obtenção de espectros tanto no ramo Stokes quanto no anti-Stokes, já os filtros *edge* permitem medidas em apenas um dos ramos.

Apesar do ramo Stokes apresentar maior intensidade que o ramo anti-Stokes, o espectro Raman Stokes ainda é pouco intenso devido à pequena fração de fótons que são espalhados de forma inelástica, dificultando o uso da espectroscopia Raman para detectar analitos em baixas concentrações. Dessa forma estratégias de intensificação são sempre buscadas. Nessa tese foi escolhido o SERS com emprego de metais para desenvolver sensores para detecção de moléculas em baixas concentrações.¹⁷⁻²⁵

2.2 Espalhamento Raman intensificado por superfície

A descoberta do SERS se deu em 1974, quando Fleischmann *et al.*²⁶ observaram um aumento na intensidade do espectro Raman da piridina adsorvida em um eletrodo de prata quando comparado ao espectro Raman da piridina em solução. Esse aumento na intensidade foi atribuído ao aumento da área superficial devido à rugosidade dos eletrodos, o que aumentaria o número de moléculas adsorvidas por

área irradiada. Essa explicação parecia ser a mais natural, uma vez que a intensidade Raman é diretamente proporcional ao número de espalhadores.²⁷ Porém, havia dúvidas se apenas essa era a razão responsável pelo fenômeno observado, uma vez que as intensidades Raman eram bastante elevadas.

Em 1977 dois trabalhos, independentes entre si, demonstraram simultaneamente que havia um fator de intensificação que era da ordem de 10^5 a 10^6 para esse mesmo sistema.^{28,29} As intensidades Raman foram maiores comparadas à observada por Fleischmann. Isso se deve a otimização dos experimentos que mostraram que a partir das condições de rugosidade usadas por Fleischmann, os sinais Raman da superfície aumentaram à medida que a rugosidade da superfície diminuiu até atingir um nível ótimo. Ficou claro que esse efeito não poderia ser explicado simplesmente por um aumento da área superficial do eletrodo de prata, e os autores sugeriram que havia outro mecanismo de intensificação. Enquanto van Duyne e Jeanmaire²⁸ associaram o efeito a um aumento do campo eletromagnético na superfície metálica rugosa, Albrecht e Creighton²⁹ o associaram ao surgimento de uma banda de absorção de transferência de carga entre a molécula adsorvida e a superfície metálica.³⁰

Em 1978, considerando as ideias de van Duyne sobre o aumento do campo eletromagnético próximo à superfície metálica, Moskovits associou pela primeira vez os efeitos de intensificação a ressonâncias plasmônicas de nanoestruturas metálicas constituídas de prata, ouro e cobre.³¹ Em 1979, van Duyne nomeou esse efeito de SERS.³² Desde então, houve grande avanço nesta área e dois mecanismos de intensificação são aceitos atualmente para explicar o efeito SERS: o mecanismo químico, baseado na quimissorção e transferência de carga entre a molécula e a superfície; e o mecanismo eletromagnético, baseado na ressonância entre o campo elétrico da radiação incidente e *plasmons* de superfície (SPs, da sigla em inglês para *Surface Plasmons*) de nanoestruturas metálicas.^{33,34}

Na maioria das observações do SERS, o mecanismo eletromagnético apresenta maior contribuição na intensificação do espectro Raman.^{34,35} Nas próximas seções, serão abordados com maiores detalhes os mecanismos químico e eletromagnético.

2.2.1 Mecanismo químico de intensificação

A contribuição desse mecanismo no SERS vem sendo entendida como uma mudança na polarizabilidade da molécula devido à uma interação química entre a molécula e a superfície metálica e/ou transferências de carga no conjunto molécula-metal.³⁶ Quando isso ocorre, se espera deslocamento ou intensificação de apenas algumas bandas de um espectro Raman, ou até mesmo desaparecimento de algumas bandas ou sua diminuição drástica de intensidade.³³ A Figura 3 mostra uma representação das possíveis transições de transferência de carga no conjunto molécula-metal e da transição eletrônica entre os níveis moleculares.

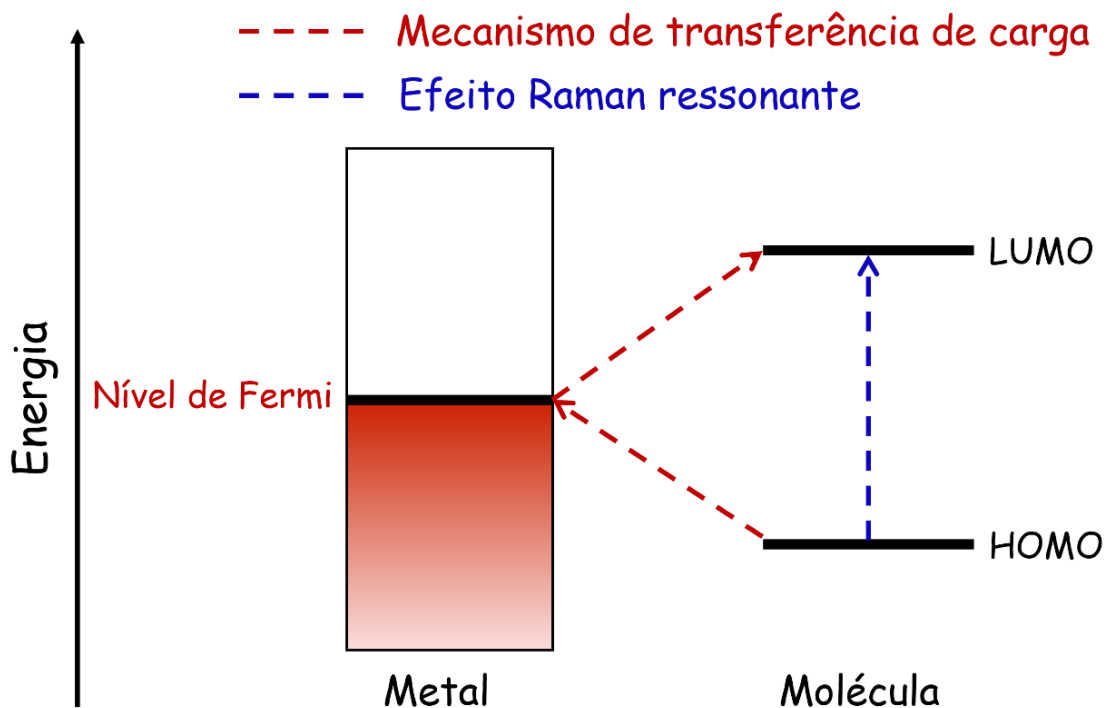


Figura 3. Representação das transições de transferência de carga (seta vermelha) no conjunto molécula-metal e da transição eletrônica entre os níveis moleculares (seta azul). Adaptada de Lombardi e Birke.^{37,38}

Para a máxima intensificação, a diferença de energia entre o orbital ocupado de maior energia (HOMO, da sigla em inglês para *Highest Occupied Molecular Orbital*) da molécula e o nível de Fermi do metal deve ser equivalente a diferença de energia entre o nível de Fermi do metal e o orbital não ocupado de menor energia (LUMO, da sigla em inglês para *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) da molécula. Sendo assim, podem ocorrer tanto transições de transferência de carga da molécula para o metal

quanto do metal para a molécula, conforme representado pelas setas em vermelho na Figura 3.

Quando a energia da radiação incidente é equivalente à energia de transição eletrônica, ou seja, a radiação é capaz de excitar a molécula para o primeiro estado eletrônico excitado, ocorre o fenômeno de espalhamento Raman ressonante, no qual os modos vibracionais associados à transição eletrônica resultam em bandas mais intensas.¹¹

2.2.2 Mecanismo eletromagnético de intensificação

A contribuição desse mecanismo no SERS está baseada na intensificação do campo elétrico nas imediações de NPs metálicas devido à ressonância do campo elétrico da radiação incidente com SPs. Esses SPs, sob uma determinada condição, podem ser ativados tanto em filmes metálicos de espessura nanométrica, que levam à ressonância de *plasmon-polariton* de superfície (SPPR, da sigla em inglês para *Surface Plasmon Polariton Resonance*), quanto em nanopartículas metálicas, que levam à ressonância de *plasmon* de superfície localizado (LSPR, da sigla em inglês para *Localized Surface Plasmon Resonance*).³⁹

O fenômeno de LSPR ocorre quando uma radiação é incidida em nanopartículas metálicas de tamanho muito menor que o comprimento de onda dessa radiação.⁴⁰ Nesse caso, o campo elétrico oscilante da radiação interage com os elétrons da nanopartícula metálica perturbando a nuvem eletrônica de forma a deslocá-la fisicamente (Figura 4). A atração coulombiana entre elétrons e núcleos gera uma força restauradora, promovendo uma oscilação coletiva e coerente da nuvem eletrônica.⁴⁰

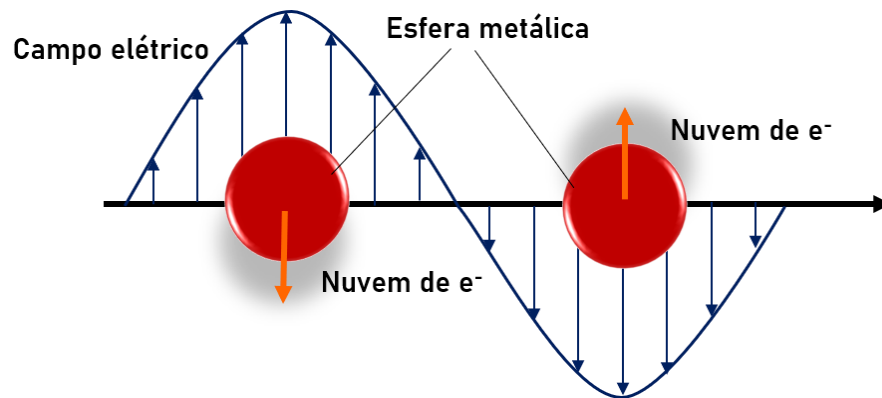


Figura 4. Ilustração esquemática da oscilação dos elétrons em uma nanoesfera (aproximação quase estática).

Os campos elétricos próximos à superfície de nanopartículas metálicas são fortemente aumentados e confinados na superfície em decorrência da LSPR.⁴⁰ Por essa razão, moléculas que experimentam esse campo apresentam intensificação no espectro Raman. Quando nanopartículas metálicas se encontram muito próximas entre si, tais como em dímeros, trímeros ou grandes agregados, pode haver interferência entre os *plasmons* de superfície das nanopartículas metálicas. Se essa interferência se dá de maneira que o valor do campo elétrico, em pelo menos algumas das regiões entre partículas, é aumentado, o que é chamado de interferência construtiva, esse campo elétrico aumentado nas imediações das partículas resulta em intensificações por SERS de várias ordens de grandeza.⁴¹ Estas regiões de campo elétrico intenso que geram elevadas intensificações do espectro Raman são denominadas *hot spots* (Figura 5).⁴²

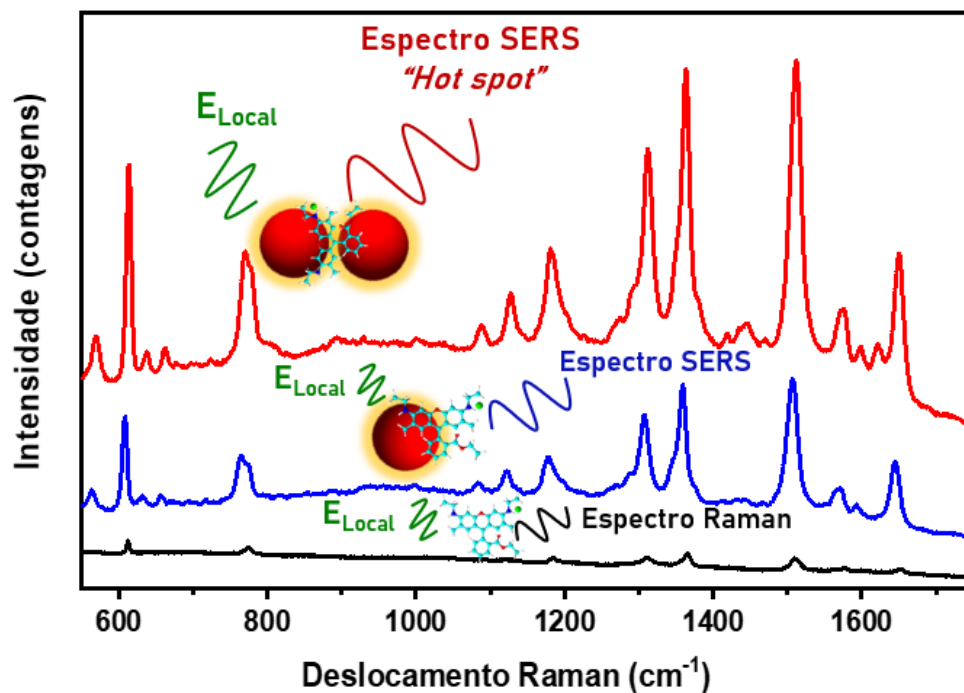


Figura 5. Representação do espalhamento Raman para a molécula R6G em condições de Raman convencional, SERS e *hot spot*, no qual E representa o campo elétrico da radiação incidente. Adaptada de Godoy.⁴³

A intensidade SERS é altamente dependente da distância entre partículas para maximizar o campo elétrico experimentado por uma molécula situada nessa região.^{44,45} Entretanto, é um desafio de longa data controlar a localização das nanopartículas, em decorrência de seus pequenos volumes, para realizar o devido acoplamento das LSPRs.^{40,46,47} Consequentemente, os maiores desafios para o SERS são a obtenção de substratos com elevada reprodutibilidade de espectros para amostras em baixas concentrações. A próxima seção apresenta alguns exemplos e estratégias para a obtenção de melhores substratos SERS.

2.2.3 Substratos SERS

Alguns parâmetros importantes das nanopartículas metálicas são levados em conta na concepção de substratos SERS, como sua composição química, seu tamanho, sua forma, a maneira como se organizam e, em alguns casos, sua razão de aspecto.⁴⁸⁻⁵⁵

Na literatura científica é possível encontrar diferentes estratégias para obtenção de substratos SERS, através de métodos como a formação de coloides,⁵⁶⁻⁵⁸ a agregação de nanopartículas metálicas,⁵⁹ eletrodeposição⁶⁰ e filmes finos.⁶¹ Por

outro lado, há também métodos mais sofisticados que consistem na auto-organização de AuNRs com diferentes diâmetros,⁶² distribuição de nanopartículas de ouro ao longo de canais internos de alumina porosa,⁶³ a agregação de nanopartículas induzidas por solventes orgânicos, como álcoois,⁶⁴ ou o uso de moléculas como cucurbiturilas⁶⁵ para formar *hot spots*. Outras estratégias de análise por SERS relacionadas vão desde a dinâmica de secagem da solução de um analito no substrato SERS^{66,67} até análises *in situ* realizadas por microfluídica com fluxo contínuo.⁶⁸

Em relação à dinâmica de secagem da solução de um analito, Liu *et al.*⁶⁷ obtiveram matrizes de *hot spot* tridimensionais (3D) de nanopartículas de prata (AgNPs, da sigla em inglês para *Silver Nanoparticles*) encapadas com citrato. Este sistema se mostrou muito eficiente para aplicação em SERS utilizando a rodamina 6G (R6G) como molécula sonda, atingindo detecções de concentrações de até 5×10^{-19} mol L⁻¹. O trabalho consistiu na simples mistura da molécula de interesse com as AgNPs em meio aquoso, seguido do gotejamento dessa mistura em uma superfície hidrofóbica de Si com funcionalização. Os testes foram realizados em diferentes concentrações de R6G na mistura. À medida em que a água evapora da superfície da gota, as partículas se aproximam umas das outras, e as moléculas a serem analisadas ficam presas entre as partículas mais próximas. Dessa forma, uma matriz de *hot spot* 3D pode fornecer uma base estrutural para aprisionar moléculas nas regiões entre partículas, o que é vantajoso em um substrato SERS. A Figura 6 fornece uma ilustração aproximada deste sistema.

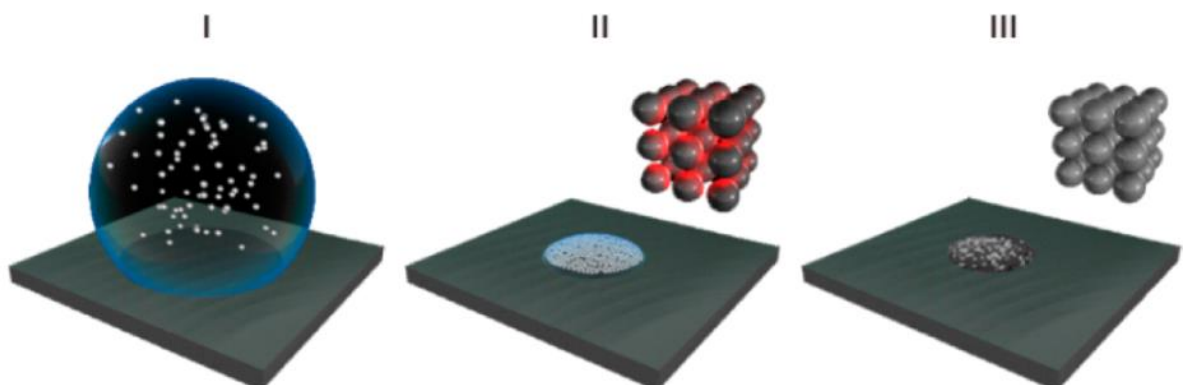


Figura 6. Esboço representando (I) uma gota contendo AgNPs em uma superfície hidrofóbica, (II) partículas distribuídas em um espaço 3D formado no processo de evaporação da água, e (III) a agregação e deposição de AgNPs no substrato antes da deposição de analito, o que não resulta em uma matriz de *hot spot* 3D. Adaptada de Liu *et al.*⁶⁷

Outros trabalhos que têm contribuído para o desenvolvimento de substratos SERS são aqueles baseados em NPs anisotrópicas.⁶⁹ As interações entre as pontas dessas partículas anisotrópicas geram um intenso campo eletromagnético, possibilitando o desenvolvimento de substratos SERS mais sensíveis.⁶⁹ Em particular, alguns trabalhos têm buscado a organização de AuNRs ponta a ponta para a produção de substratos com maior sensibilidade e reprodutibilidade de espectros SERS.^{65,70,71} Jones *et al.*⁶⁵ demonstraram que AuNRs podem ser alinhados com uma distância de 0,9 nm entre nanobastões usando cucurbiturilas. Eles também realizaram simulações eletromagnéticas para cadeias retas e desordenadas de AuNRs organizados ponta a ponta e mostraram que lacunas estreitas entre AuNRs são importantes para obter elevadas intensificações (Figura 7 (a)). Os maiores valores de campo elétrico, localizados em uma das lacunas da cadeia, foram de aproximadamente 565 e 455 vezes o campo incidente para as cadeias retas e desordenadas, respectivamente. Esse sistema demonstrou ser eficaz para detecções por SERS de moléculas de R6G em concentração de 10^{-7} mol L⁻¹.

Em outro trabalho, Lee *et al.*⁷² estudaram o comportamento da organização lado a lado de AuNRs e observaram uma redução na intensidade SERS em comparação com AuNRs desorganizados [Figura 7 (b)]. Eles também mostraram por meio de simulações pelo método *Finite-Difference Time-Domain* (FDTD) que há uma redução da intensidade do campo elétrico à medida que o número de nanobastões organizados lado a lado aumenta [Figura 7 (b)]. A conclusão do trabalho foi que a interferência entre os *plasmons* de superfície dos nanobastões organizados lado a lado ocorre de maneira destrutiva. Dessa forma, a organização de AuNRs ponta a ponta apresenta maior potencial, uma vez que as interferências nesse caso se dão de maneira construtiva, o que pode gerar elevadas intensificações do campo elétrico e resultar em substratos mais sensíveis e reprodutíveis para o desenvolvimento de sensores baseados em SERS.

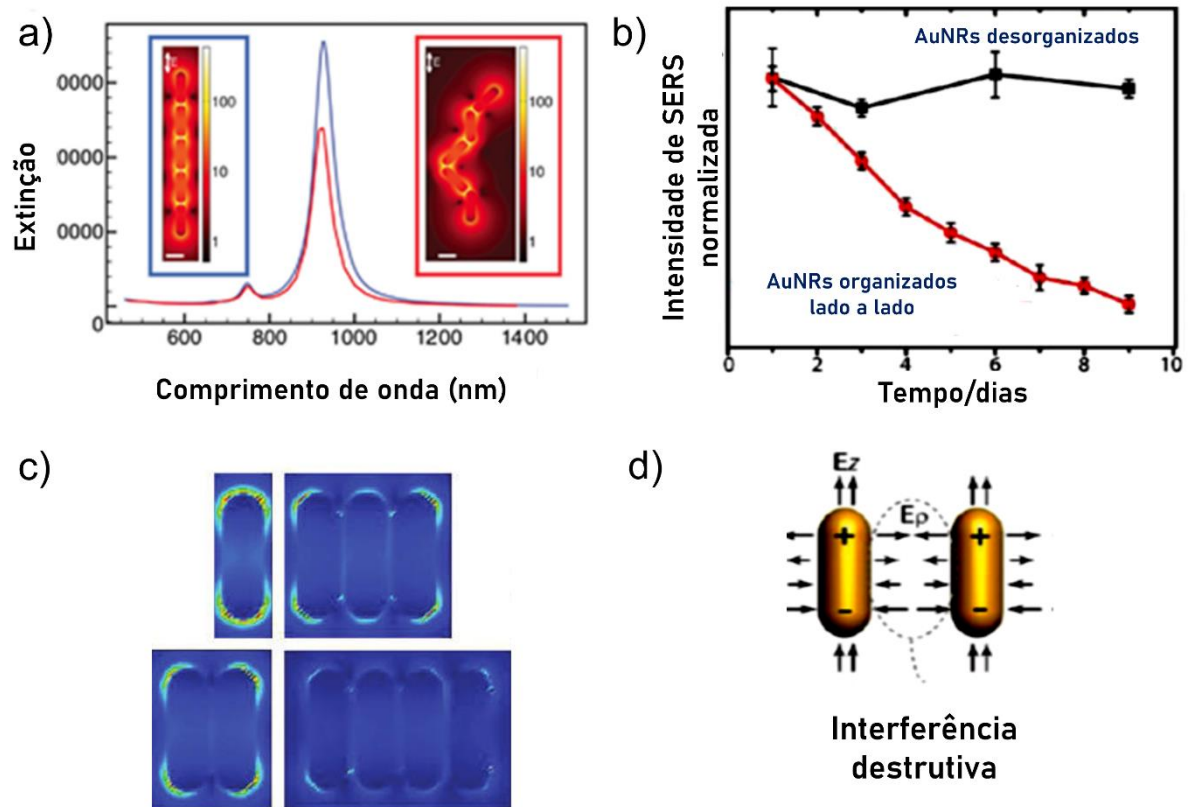


Figura 7. (a) Espectro de extinção simulado que descreve a comparação direta entre correntes retas (azul) e desordenadas (vermelho) de AuNRs organizados ponta a ponta com separação de 1 nm. Figura adaptada de Jones *et al.*⁶⁵. (b) Comparação da intensidade SERS experimental para estruturas de AuNRs organizados lado a lado e desorganizadas. (c) Exemplos de perfis de intensidade de campo elétrico produzidos via simulação para a organização lado a lado de nanobastões. (d) Ilustração esquemática de AuNRs organizados lado a lado mostrando uma redução do campo elétrico devido à interferência destrutiva. Adaptada de Lee *et al.*⁷².

Recentemente, algumas estratégias têm sido adotadas para substratos SERS com cavidades cobertos com uma película fina metálica (Ag ou Au), onde predomina a SPR do substrato metálico^{73–77}. Os efeitos de cavidade na superfície induzidos pela radiação incidente são chamados de *'hot spot area'*.⁷⁸ A vantagem mais significativa de um substrato SERS com cavidades é atribuída às regiões de alta intensidade de campo eletromagnético (EM) gerada pelas próprias cavidades e a maior probabilidade de encontrar moléculas confinadas nestas regiões.⁷⁸ Por exemplo, Li *et al.*⁷⁸ fabricaram um substrato SERS com uma matriz de cavidades em V e W a partir da corrosão anisotrópica úmida com hidróxido de potássio em Si (100). O SERS foi investigado usando a molécula sonda 4-mercaptopiridina. Os resultados mostraram que a matriz da cavidade plasmônica em W fornece uma intensidade de sinal mais de 3 vezes mais intenso do que a cavidade plasmônica em V. Corroborado com a simulação pelo método FDTD, o desempenho do substrato SERS de cavidade foi atribuído à intensificação do campo EM que apresentou ser maior na parte superior

do que na parte inferior da cavidade. Este efeito do campo EM concentrado na superfície próxima à cavidade também foi estudado por Gu *et al.*,⁷⁶ e é conhecido como campo EM concentrado de guia de onda. Uma única nanopartícula de Ag localizada no campo EM concentrado do guia de onda aumentou o campo local em 1000 vezes, proporcionando a formação de um substrato SERS comparável àqueles em que há agregados de nanopartículas. Outra estratégia é o uso de substratos SERS híbridos no qual uma grade dielétrica, uma camada dielétrica e um espelho de ouro (Au) são usados para melhorar o desempenho SERS de AuNRs depositados ao longo do comprimento destas grades.⁷⁹ Esse desempenho é alcançado uma vez que, além da excitação LSPR dos AuNRs, a onda evanescente resultante da reflexão do espelho de Au que está por baixo da camada dielétrica interage com as LSPRs dos AuNRs (Figura 8).⁷⁹ Dessa forma, Maimaiti *et al.*⁸⁰ também demonstraram que um sistema híbrido pode ser eficiente para melhorar o desempenho de um substrato SERS. Eles utilizaram um sistema *particle-on-mirror*, composto por nanodiscos de Si em uma superfície com um filme de Au (espelho). Na região de lacuna entre uma partícula e o espelho ocorre uma intensificação do campo elétrico, que foi associada a uma interação entre os nanodiscos de Si e as cargas da imagem do espelho de Au. O sistema utilizado para a intensificação do espalhamento Raman e da fluorescência mostrou uma eficiência comparável às obtidas com o uso de uma partícula puramente metálica sobre um espelho.

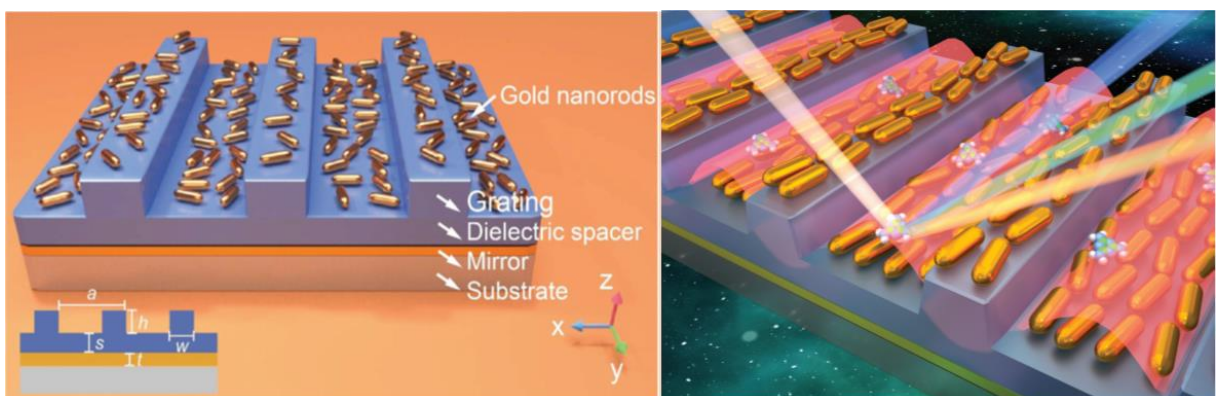


Figura 8. Ilustração esquemática de AuNRs depositados em um substrato com espelho de Au e grade dielétrica. Adaptada de Wu *et al.*⁷⁹

2.3 Espalhamento Raman em superfícies com cavidades

Embora os estudos com cavidades e filmes metálicos como espelho sejam mais recentes, há relatos sobre o efeito geométrico na intensificação Raman para cavidades sem recobrimento metálico. Brueck *et al.*^{81,82} observaram uma intensificação da banda Raman na região referente a um modo longitudinal óptico (LO) do Si (521 cm^{-1})⁸³ em grades de Si, fabricadas por meio do processo de corrosão iônica reativa (RIE, da sigla em inglês para *Reactive Ion Etching*), e associaram esse aumento à efeitos de ressonância de cavidade eletromagnética. Mamichev *et al.*⁸⁴ demonstraram que estruturas de Si corroídas, fabricadas através do processo de corrosão anisotrópica úmida (AWE, da sigla em inglês para *Anisotropic Wet Etching*), podem aumentar a intensidade do espectro Raman de Si usando um comprimento de onda de radiação incidente semelhante à espessura da parede do Si, associando o fenômeno também a um efeito de ressonância. Dessa forma, a combinação de substratos com cavidades, sem filmes metálicos, e nanopartículas metálicas poderia ser uma alternativa para criar substratos SERS com alta reprodutibilidade.



Considerando os aspectos abordados nessa introdução para melhorar a intensidade de espectros Raman, algumas questões são levantadas e esse trabalho se propõe a respondê-las:

- ✓ Alinhamentos ponta a ponta de AuNRs podem ser formados em microcanais em forma de V no Si, cujas dimensões no fundo desses microcanais são similares a de AuNRs, para então obter *hot spots* mais intensificadores?
- ✓ Outras configurações de AuNRs dentro de microcanais, como estruturas 3D, podem resultar em um substrato SERS eficiente?
- ✓ E na ausência de AuNRs, o próprio microcanal em forma de V no Si pode apresentar efeito de intensificação Raman, assim como observado para grades de Si na ordem nanométrica?

3 Objetivos

Considerando as questões levantadas na introdução dessa tese, esse trabalho se propôs a:

- ✓ Fabricar microcanais em forma de V em Si (100);
- ✓ Sintetizar AuNRs;
- ✓ Depositar AuNRs dentro dos microcanais em forma de V e obter configurações de alinhamento ponta a ponta e de estruturas tridimensionais;
- ✓ Criar substratos SERS com elevada sensibilidade e reprodutibilidade capazes de detectar moléculas em concentrações ultrabaixas;
- ✓ Investigar, por meio da espectroscopia Raman e simulações por elementos finitos do campo elétrico, um possível efeito de intensificação nos microcanais em forma de V na ausência de AuNRs.

Uma melhor visualização dos objetivos desse trabalho se encontra na ilustração da Figura 9.

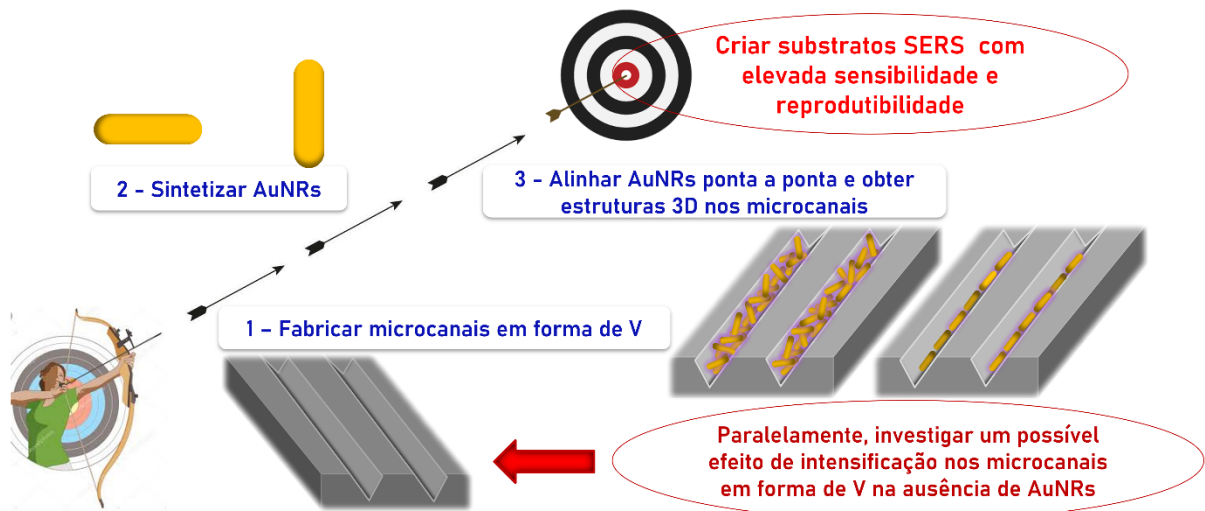


Figura 9. Ilustração dos objetivos propostos no presente trabalho.

4 Parte experimental

4.1 Materiais

Os substratos com microcanais foram fabricados em *wafer* de Si (100) / SiO₂ (2 μm de espessura de SiO₂) com 9x9 mm de tamanho. 1,1,1,3,3,3,3-hexametildissilazano (HMDS), AZ[®] nLOF[™] 2020 *photoresist*, AZ[®] 726 MIF *developer*, acetona VLSI (C₃H₆O; da sigla em inglês para *Very Large Scale Integration*), e álcool isopropílico VLSI (C₃H₈O) foram adquiridos da fabricante MicroChemicals. Ácido tetracloroáurico tri-hidratado (HAuCl₄.3H₂O), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB, da sigla em inglês para *Cetyltrimethylammonium Bromide*, ≥ 99% m/m), hidróxido de potássio (KOH, 90% m/m) e dissulfeto de tetrametil-tiuram (Tiram, 98% m/m) foram adquiridos da fabricante Sigma-Aldrich. Hidróxido de sódio (NaOH, Para Análise - P.A.), peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 29% m/m), acetona (C₃H₆O, P.A.), e ácido nítrico (HNO₃, 68% m/m) foram adquiridas da fabricante Synth. Ácido clorídrico (HCl, 37% m/m) foi adquirido da fabricante Vetec. Ácido fluorídrico (HF, 50% m/m, diluído para 1% v/v) foi adquirido da fabricante Technic. Rodamina 6G (R6G, 99% m/m) foi adquirida da fabricante Acros Organic.

A solução de R6G foi preparada a 10⁻³ mol L⁻¹ em água desionizada e diluída até 10⁻¹⁸ mol L⁻¹. A solução de Tiram foi preparada a 10⁻² mol L⁻¹ em acetona e diluída em água desionizada até 10⁻¹⁰ mol L⁻¹.

4.2 Instrumentação

O equipamento *spin coater* WS-650-23B Laurell Technologies Corporation[®] foi utilizado para a deposição da resina fotossensível AZ[®] nLOF[™] 2020; o equipamento para fotolitografia de escrita direta MicroWriter[®] ML3 foi empregado na exposição ultravioleta (UV); PlasmaPro[®]NGP80 (Oxford Instruments Plasma Technology) foi empregada na corrosão RIE. As medidas ópticas confocais foram realizadas usando um Microscópio Confocal de Varredura a Laser 3D (LSCM, da sigla em inglês para *Laser Scanning Confocal Microscopy*) - VK-X200 (Keyence), comprimento de Onda - 408 nm, violeta. A caracterização microscópica foi obtida por microscopia eletrônica

de varredura (SEM, da sigla em inglês para *Scanning Electron Microscopy*), utilizando um equipamento FEI® Quanta 250 FEG, por microscopia eletrônica de transmissão (TEM, da sigla em inglês para *Transmission Electron Microscopy*), utilizando um equipamento Zeiss Libra 120 e por microscopia de força atômica (AFM, da sigla em inglês *Atomic Force Microscopy*), utilizando um equipamento Park Systems - NX10. Os espectros Raman e SERS foram coletados utilizando um espectrômetro Raman Horiba Jobin Yvon T64000, acoplado a um microscópio Olympus BX41 e um detector de carga acoplada, utilizando um laser de He-Ne (Research Electro-Optics) de 633 nm de comprimento de onda. As análises Raman foram obtidas utilizando uma lente objetiva de 50 vezes de aumento com 20 s de exposição à radiação incidente. A banda LO do Si cristalino, em $520,7 \text{ cm}^{-1}$, foi usada para a calibração do espectrômetro.

4.3 Procedimentos

4.3.1 Microfabricação de canais

Os microcanais em forma de V foram fabricados na sala limpa do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), sob orientação do Dr. Carlos Cesar Bof Bufon e colaboração do Ms. Davi Henrique Starnini de Camargo e da química Mariane Peres Pereira. Substratos de Si (100) com dimensão de 9x9 mm foram utilizados na fabricação de canais em forma de V a partir do processo AWE, utilizando solução de KOH 40% (m/v) a 80 °C e uma máscara de SiO₂ padronizada para proteger as regiões demarcadas de Si durante o processo de corrosão AWE. Para obter a máscara padronizada de SiO₂ foram utilizados processos de fotolitografia e RIE antes do processo AWE. A Figura 10 corresponde à ilustração de cada etapa utilizada para a microfabricação dos canais.

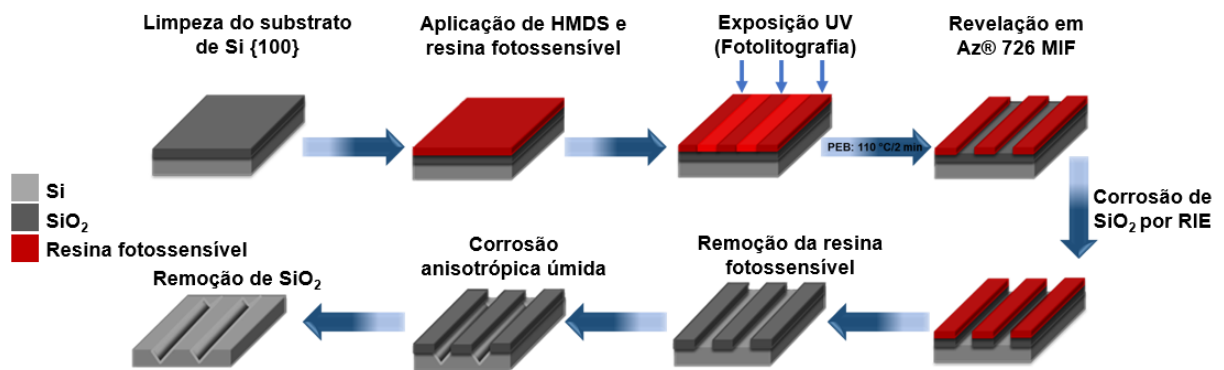


Figura 10. Ilustração esquemática dos processos de microfabricação para obtenção de microcanais em forma de V em substrato de Si (100). Adaptada de Bär *et al.*⁸

O substrato de Si (100) foi previamente limpo por imersão em acetona P.A., seguido por imersão em acetona de grau VLSI e álcool isopropílico de grau VLSI durante 40 min cada. Em seguida, os substratos foram submetidos ao plasma de oxigênio para remover os resíduos orgânicos. Logo após, o HMDS, que atua como um promotor de aderência da resina fotossensível no substrato, foi aplicado na superfície utilizando o *spin coater* (3000 rpm durante 30 s). Após a deposição do HMDS, os substratos foram aquecidos a 100 °C durante 3 min em uma chapa de aquecimento. Em seguida, o AZ[®] nLOF 2020, uma resina fotossensível negativa, foi espalhada sobre a superfície usando as seguintes etapas sequenciais de revestimento no *spin coater*: i) 2000 rpm durante 5 s; ii) 3000 rpm durante 30 s; iii) 1000 rpm durante 5 s. Os substratos com as resinas fotossensíveis depositadas foram colocados em uma chapa de aquecimento a 100 °C durante 2 min, procedimento conhecido como *soft-bake*.

Na sequência, foi realizado o processo de fotolitografia utilizando o equipamento MicroWriter[®] ML3. O desenho da máscara virtual foi realizado por meio do software CleWin 5 e o padrão litográfico preparado contém 26 microcanais com 5 mm de comprimento e 4 µm de largura. O espaçamento entre os microcanais foi de 100 µm para aqueles mais próximos da borda do substrato e espaçamento de 20 µm entre os que se encontram no centro do substrato. Todos os microcanais foram identificados de A a Z na extremidade superior. A Figura 11 mostra a máscara virtual utilizada no processo de fotolitografia para a obtenção dos microcanais.

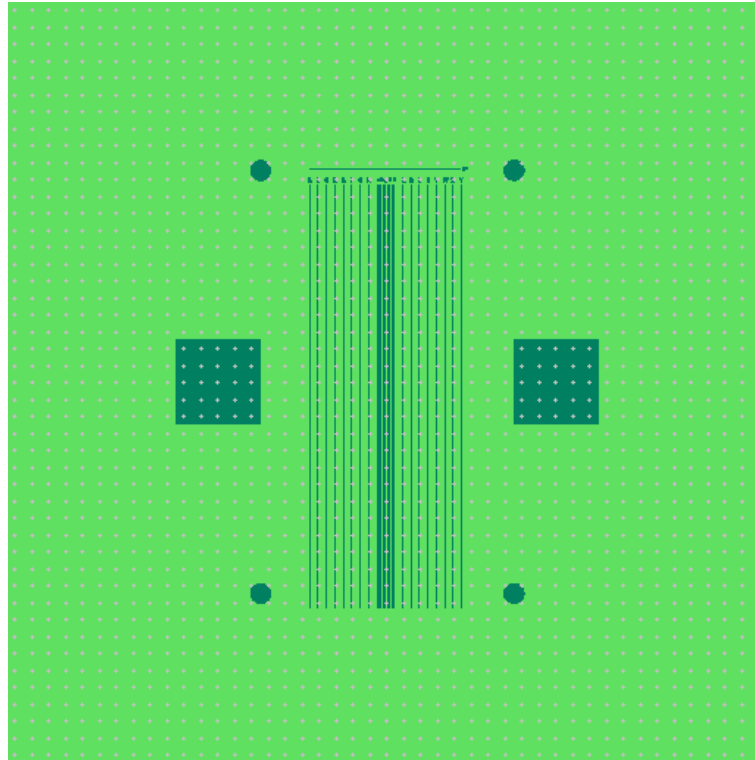


Figura 11. Máscara virtual utilizada no processo de fotolitografia. Os quadrados servem como referência para o processo de corrosão RIE realizado logo após ao processo de fotolitografia. Adaptada de Bär *et. al.*⁸

Como a resina fotossensível utilizada é negativa, as regiões fora dos canais (parte verde clara da máscara) foram expostas à luz UV durante a fotolitografia. Em seguida, os substratos foram colocados na chapa de aquecimento a 110 °C durante 2 min, processo conhecido como *Post-Exposure Bake* (PEB). Os parâmetros de exposição utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de exposição do processo de fotolitografia.

Resolução	1µm/x10 (lente de 10x)
Qualidade	Normal
Bloqueio de foco	Ligado
Dose	70mJ/cm ²
PEB	110°C por 2 minutos
Área usada do DLP (<i>Digital Light Processor</i>)	90%

O padrão litográfico na superfície foi revelado em solução básica de AZ[®] 726 MIF por 30 s e imerso imediatamente em água desionizada. Neste processo, a parte

da resina fotossensível que não foi exposta à luz UV (região dos microcanais) é removida. Após secagem com fluxo de N₂, o substrato foi levado ao microscópio óptico para monitoramento do estágio de revelação.

O substrato foi colocado na chapa de aquecimento a 110 °C por 10 min, procedimento conhecido como *hard bake*, que tem como intuito aumentar a resistência da resina fotossensível ao processo de corrosão RIE. Essa resina fotossensível foi então utilizada como máscara para realizar a corrosão do SiO₂ (2 µm) por RIE até atingir o Si. Os parâmetros utilizados no processo de corrosão do SiO₂ estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros do processo de corrosão RIE.

Plasma de Ar	40 sccm
Plasma de CHF₃	10 sccm
Pressão	10 mTorr
Ângulo	46,8 Deg
Temperatura	5 °C
Tempo	24 min
Plasma indutivo (ICP)	400 W
Alta frequência (HF)	100 W

Após o processo de corrosão RIE, a resina fotossensível foi removida por meio da imersão dos substratos em solução comercial TechniStrip® Micro D2 por 5 min em banho de ultrassom. Plasma de O₂ foi realizado durante 5 min para remoção de resíduos orgânicos provenientes da solução de D2. Assim, a máscara de SiO₂ foi obtida e o processo AWE foi executado na sequência.

Com o auxílio de um suporte (Figura 12), cada substrato foi imobilizado de forma que sua superfície ficasse perpendicular ao fundo do frasco que continha a solução de KOH, de modo que o comprimento dos microcanais se situassem na posição horizontal. Dessa forma, a turbulência durante a agitação com uma barra magnética na solução ocorreria de forma bastante homogênea. O tempo de corrosão AWE foi variado até se observar imagens, por meio do microscópio confocal, que indicavam que a produção dos substratos de Si com microcanais em forma de V tinha sido realizada. Os substratos passaram por um processo de limpeza em solução de

HF 1% v/v após a corrosão AWE. Para avaliar melhor os microcanais fabricados, imagens de SEM foram obtidas posteriormente.

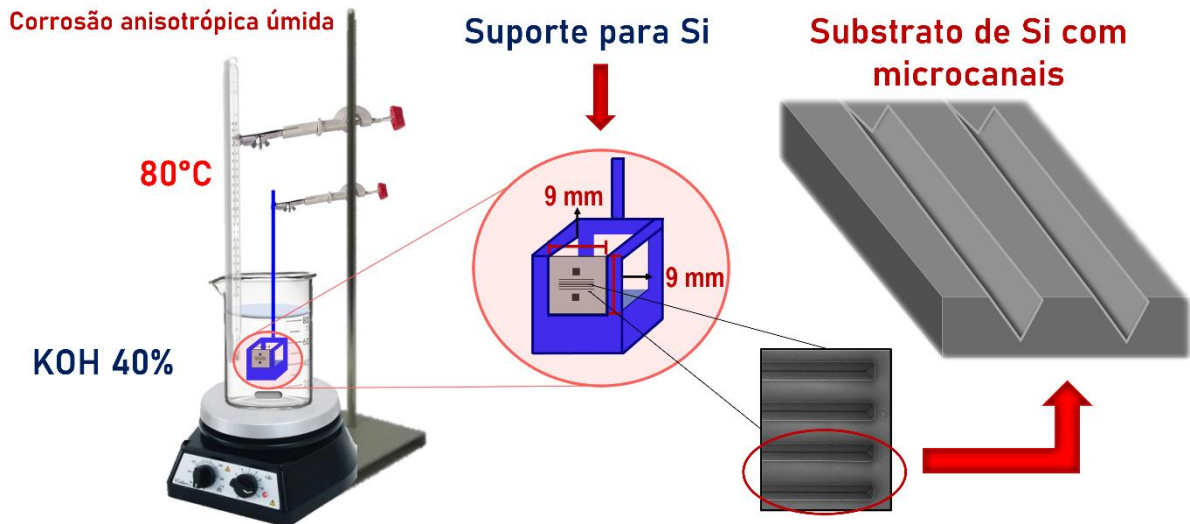


Figura 12. Ilustração do processo de corrosão anisotrópica úmida do Si (100) em solução de KOH. O suporte de amostra permitiu a imobilização do Si durante o processo de corrosão.

4.3.2 Síntese de AuNRs

Os AuNRs foram obtidos pelo método mediado por sementes conforme ilustrado na Figura 13 e de acordo com o procedimento descrito por Xu *et al.*⁸⁵, usando H_2O_2 em meio básico como agente redutor.

Preparação das sementes: 0,1458 g de CTAB foram dissolvidos em um balão de fundo redondo contendo 4 mL de água desionizada ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e colocados sob banho de água a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação. Após a dissolução do CTAB, 45 μL de solução de HAuCl_4 (29 mmol L^{-1}) e 24 μL de solução de NaBH_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, resfriada em banho de água com gelo), foram adicionados nessa sequência. A agitação foi interrompida após 2 min e a síntese da semente foi mantida por 2 h a $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

Procedimento de crescimento dos AuNRs: 1,8222 g de CTAB foi dissolvido em 50 mL de água desionizada ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), dentro de um balão de fundo redondo fixado em um suporte universal, e a solução foi mantida a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ sob banho de água em uma chapa de aquecimento e agitação. Após a dissolução do CTAB, 25 μL de AgNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 900 μL de HAuCl_4 (29 mmol L^{-1}), 167 μL de NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e 28 μL de H_2O_2 (29% m/m) foram adicionados nesta sequência e agitados por 2 min. Em seguida, 150 μL de solução da semente preparada foram adicionados e a solução foi

agitada por 30 s e mantida sob banho de água a 28 °C por 2 h. Por fim, a suspensão coloidal obtida foi centrifugada a 8000 rpm (centrífuga Eppendorf 5418) durante 30 min para remover o excesso de CTAB e redispersa em 10 mL de água desionizada.



Figura 13. Ilustração do processo de síntese de AuNRs mediado por sementes.

4.3.3 Fabricação de substratos SERS

AuNRs foram depositados nos substratos de Si com microcanais em forma de V e nos substratos de Si sem microcanais através do método por gotejamento. O método de deposição foi adaptado do descrito por Ashkar *et al.*⁷¹ Para isto, 100 μL de suspensão coloidal de AuNRs (estoque) foram diluídos em 900 μL de água desionizada. Uma alíquota de 10 μL dessa suspensão coloidal de AuNRs foi depositada nos substratos de Si com microcanais em forma de V, inclinados em um ângulo de 5° em relação à horizontal e com os microcanais na direção do fluxo, seguido pela adição de 3 μL de álcool isopropílico para reduzir a hidrofobicidade do substrato de Si e facilitar a entrada dos AuNRs nos microcanais. Logo após a adição de álcool isopropílico, a gota escorre para a extremidade do substrato, saindo um pouco da região dos canais. Para garantir que a gota seque inteiramente na região central do substrato, onde os canais estão localizados, os substratos foram girados em 180° em relação a horizontal (trocando parte inferior com superior), mantendo mesmo ângulo de inclinação. O substrato foi deixado para secar a temperatura ambiente durante 2 h. Este processo foi repetido mais duas vezes após a secagem da gota, totalizando 30 μL de AuNRs e 9 μL de álcool isopropílico. Após a secagem

completa do substrato, ele foi imerso em 5 mL de água desionizada durante 5 min e secado com fluxo de N_2 . Na sequência, o substrato foi posicionado novamente sob inclinação de 5° e 10 μL de solução de R6G foram adicionados. Em cada substrato, foi adicionada uma concentração diferente de R6G entre 10^{-6} até 10^{-18} mol L^{-1} . Para fim de comparação, o mesmo procedimento foi realizado em substratos sem microcanais, porém a concentração de R6G detectada foi de 10^{-6} até 10^{-10} mol L^{-1} . A Figura 14 (a, b) corresponde à ilustração das etapas de preparação dos substratos SERS com microcanais em forma de V.

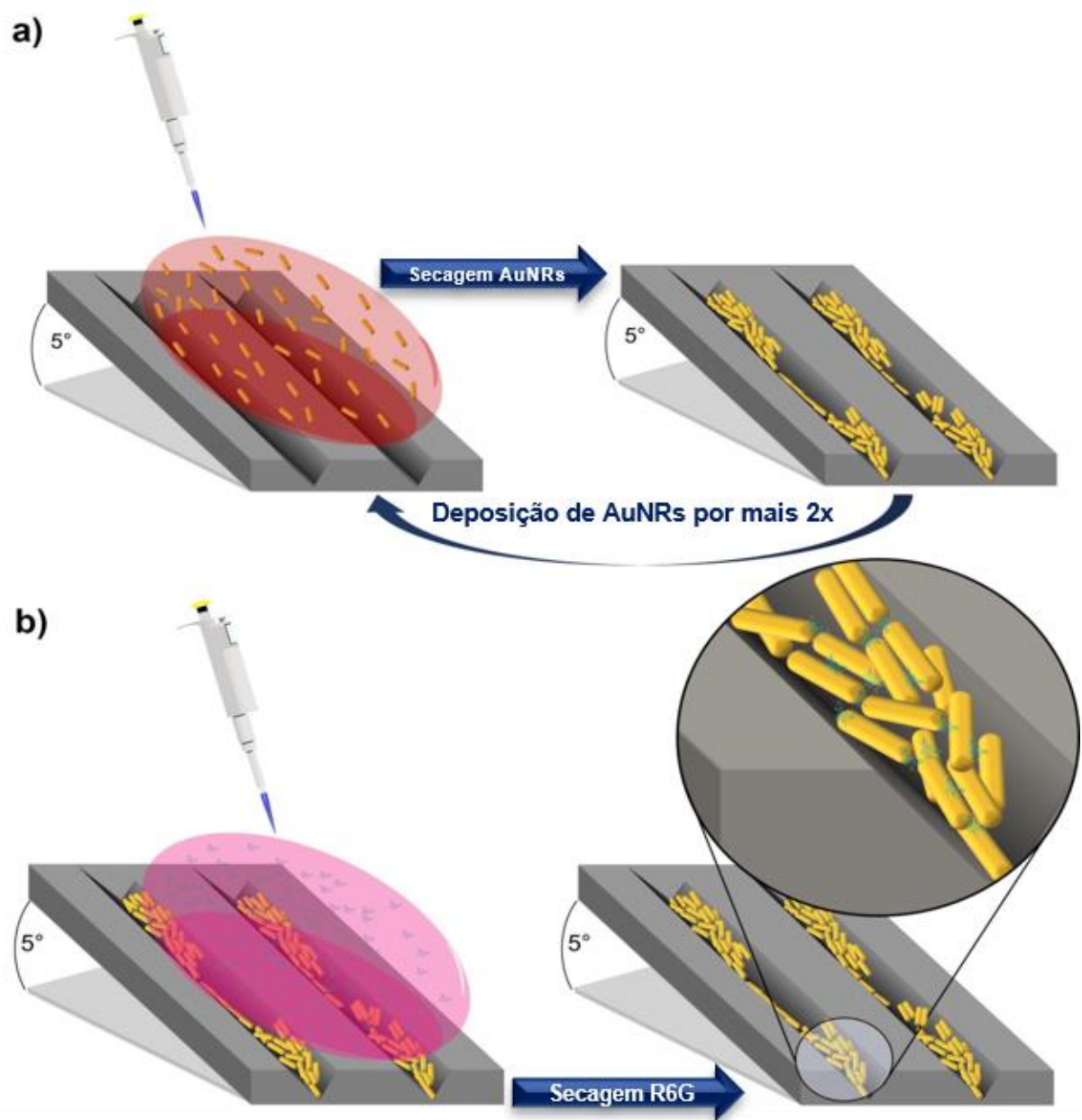


Figura 14. Ilustração da (a) deposição por gotejamento da suspensão coloidal de AuNRs no substrato inclinado, e (b) moléculas de R6G adsorvidas em nanoestruturas de AuNRs no substrato com microcanais em forma de V. Adaptada de Bär *et al.*⁸

Para a molécula de Tiram, os mesmos procedimentos de deposição de AuNRs foram realizados para substratos de Si com microcanais em forma de V, variando as concentrações de solução de Tiram entre 10^{-7} e 10^{-10} mol L⁻¹.

Um processo de limpeza dos substratos com e sem microcanais foi realizado após a conclusão das análises por SERS e SEM, com o intuito de reutilizá-los. A primeira etapa da limpeza foi realizada por imersão em água régia (mistura entre HNO₃ e HCl, na proporção 1:3 v/v) para a remoção dos AuNRs, seguido da imersão em água desionizada e secagem com fluxo de N₂. A segunda etapa consiste em 5 min de plasma de O₂ com potência de 90 W e pressão de 0,3 mbar para remoção de resíduos orgânicos. A terceira etapa foi realizada por imersão em solução de HF 1% (v/v), para remoção da camada de SiO₂ que se forma devido à exposição da superfície de Si ao O₂, seguida da imersão em água desionizada e secagem com fluxo de N₂. Posteriormente os substratos foram imersos em acetona VLSI e em álcool isopropílico VLSI e secos com fluxo de N₂.

4.3.4 Espectroscopia Raman

Mapeamentos em forma de uma linha de 10 pontos para a análise da banda do Si na região de 521 cm⁻¹ foram realizados em substratos com e sem microcanais em forma de V. Para o substrato com microcanais, espectros Raman também foram obtidos em diferentes regiões de um microcanal e suas vizinhanças. O tempo de exposição utilizado nestas medidas em substratos foi de 10 s com 1 acumulação (acc). Para todos os espectros Raman foi utilizado laser com comprimento de onda de 633 nm. Mapeamentos Raman de um substrato com microcanais em forma de V, no qual foram depositados 10 µL de uma solução de R6G (10^{-3} mol L⁻¹), foram realizados em forma de uma linha de 50 pontos e distância de 3 µm entre os pontos analisados. Para os substratos sem microcanais, os mapeamentos também foram de 50 pontos e espaçamento de 3 µm, mas em forma de retângulo, 5 x 10 pontos. O tempo de exposição utilizado nestas medidas foi de 1 s com 1 acc. Os mapeamentos para a detecção de R6G em diferentes concentrações nos substratos contendo AuNRs foram realizados ao longo dos microcanais, em forma de uma linha de 50 pontos e distância de 3 µm entre os pontos analisados. Para os substratos sem microcanais, os mapeamentos também foram de 50 pontos e espaçamento de 3 µm, mas em forma

de retângulo, 5 x 10 pontos. O tempo de exposição utilizado nestas medidas foi de 20 s com 1 acc.

Os mapeamentos para a detecção de Tiram em diferentes concentrações nos substratos de Si com microcanais em forma de V contendo AuNRs foram realizados em forma de uma linha de 50 pontos e distância de 3 μm entre os pontos analisados ao longo da borda e do fundo dos microcanais. Nesses mesmos substratos, regiões sem microcanais foram também analisadas por meio de mapeamentos de 50 pontos. O tempo de exposição utilizado nestas medidas foi de 10 s com 1 acc. Foi realizado ajuste de linha de base dos espectros Raman através do *software* LabSpec 5 (ajuste automático).

4.3.5 Simulação de campo elétrico espalhado

As simulações por elementos finitos foram realizadas no software COMSOL Multiphysics, em colaboração com o Dr. Leandro das Mercês Silva, do LNNano. Um espaço bidimensional acoplado ao Módulo RF (*In-Plane Transverse Electric Waves*) foi empregado para calcular o campo elétrico espalhado pelos substratos. Os cálculos foram realizados ao longo de uma seção transversal representativa da amostra composta de espaço livre (vácuo) e um substrato de Si com uma região plana e um canal em forma de V (Figura 15). Na seção transversal da amostra com o vácuo, o Si plano tem 115 μm de comprimento, enquanto a região em forma de V tem 65 μm de comprimento (Figura 15(a)). As dimensões físicas do microcanal em forma de V são definidas de forma similar à estrutura fabricada, ou seja, uma cavidade de 4,5 μm de largura e 6,0 μm de profundidade (Figura 15(e)).

A espessura da amostra de Si foi assumida como 50 μm . Um espaço limitado (seção transversal de 240 x 240 μm^2) é definido ao redor da geometria do substrato, enquanto a condição de limite de espalhamento Plano-Onda é aplicada. Como configurações do subdomínio, a permissividade e permeabilidade relativas de cada material (vácuo e Si) são dadas pela biblioteca do programa. A simulação é completada com o campo elétrico de entrada selecionado de acordo com o comprimento de onda do laser utilizado para as análises espectroscópicas Raman, ou seja, 633 nm. A onda plana se propaga no sentido x com uma polarização do campo elétrico ao longo do eixo z. Para a configuração da malha [Figura 15(b-e)], são

utilizados elementos triangulares, com um tamanho de malha personalizado empregando fator de escala de tamanho de elemento máximo de 0,3, taxa de crescimento de elemento de 1,01, fator de curvatura de 0,5 e corte de curvatura de 0,1. Tais parâmetros resultaram em 43145 elementos de subdomínio para o cálculo por elementos finitos. O campo elétrico espalhado é calculado usando o solucionador de sistema linear direto (UMFPACK). O componente z absoluto do campo elétrico espalhado é considerado para a elucidação da influência do canal em forma de V no espalhamento Raman em comparação com substratos sem microcanais.

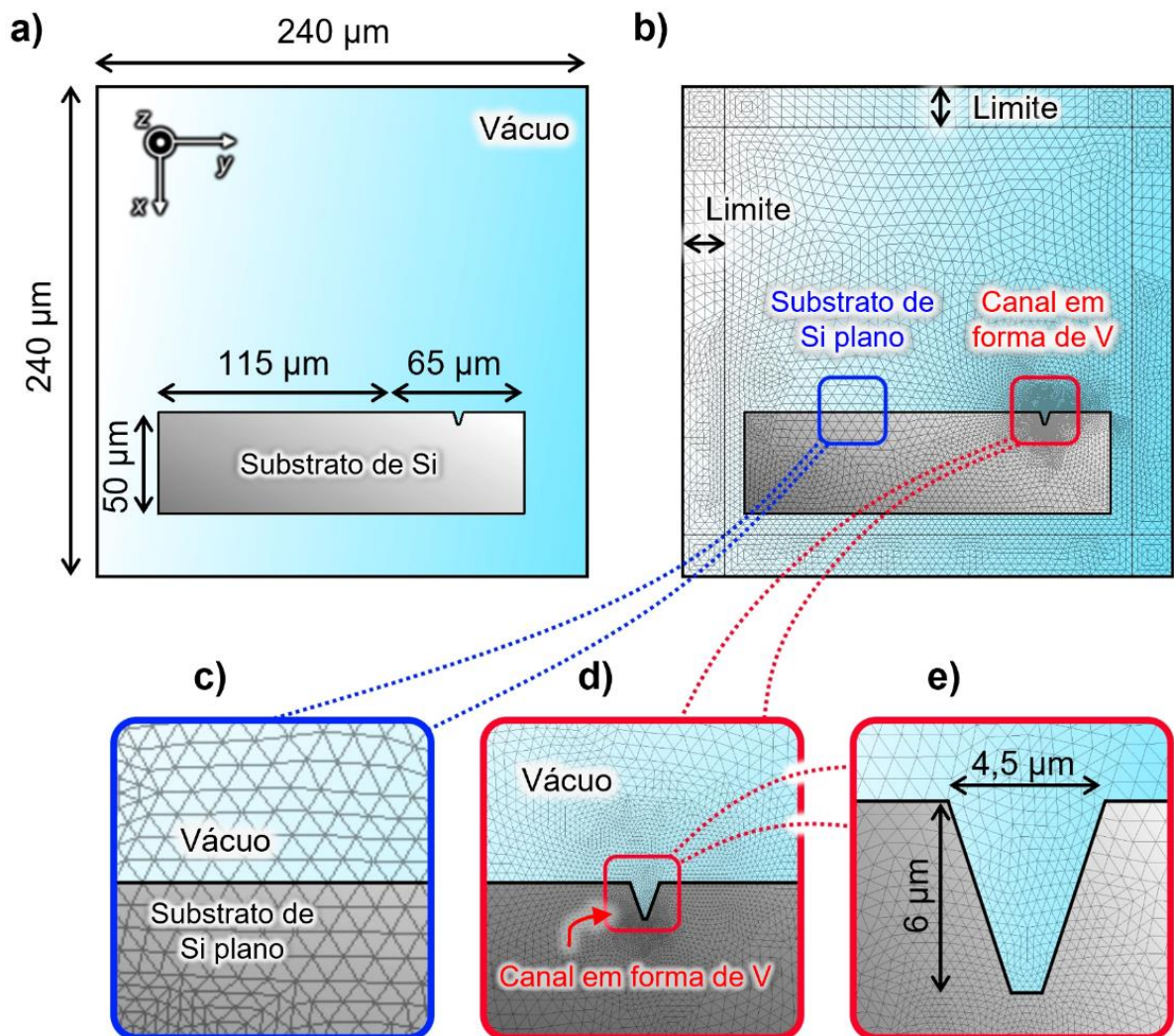


Figura 15. Geometria e malha para simulação por elementos finitos. (a) Geometria de amostra considerada para a simulação. (b) Configuração da malha empregada nos subdomínios de simulação. (c) Vista detalhada da configuração da malha do substrato de Si plano. (d) Visão detalhada da configuração da malha na região do canal em forma de V. (e) Visão detalhada do canal em forma de V. As dimensões do objeto são mostradas nas imagens (a) e (e). Adaptada de Bär *et al.*⁸

4.3.6 Visualização de informação

A análise dos espectros SERS foi realizada por meio de técnicas de projeção multidimensional, em colaboração com o Dr. Flávio Makoto Shimizu. O uso dessas técnicas facilita a visualização de dados multivariados através do reconhecimento de padrão, principalmente quando se trata de um conjunto muito grande de dados, como é o caso de mapeamentos SERS realizados nesse trabalho. Como os efeitos de dispersão são comumente observados em experimentos espectroscópicos, foi aplicada a correção de dispersão multiplicativa estendida (EMSC, da sigla em inglês para *Extended Multiplicative Scatters Correction*) usando o programa *Matlab* para diminuir a dispersão e melhorar a discriminação de dados multidimensionais. Uma maneira de visualizar os efeitos do método EMSC foi feita usando a técnica de coordenadas paralelas, onde cada linha vertical indica uma dimensão, que nesse caso corresponde a cada número de onda do espectro SERS, e cada linha horizontal indica as intensidades normalizadas dos espectros SERS que interceptam cada linha vertical.

Outra maneira de visualizar os dados foi por meio de técnicas de projeção multidimensional, que são técnicas baseadas na redução de dimensionalidade, nas quais um espectro SERS inteiro foi transformado em um único ponto em um mapa bidimensional (2D). As técnicas de projeção multidimensional utilizadas foram: *Classical Scaling* (CS),⁸⁶ *Interactive Document Mapping* (IDMAP),⁸⁷ *Sammon's Mapping* (SM),⁸⁸ e *Least Square Projection* (LSP).⁸⁹ Essas técnicas, juntamente com a técnica de visualização de informação por coordenadas paralelas, compõem o conjunto de ferramentas do programa *PEX-Sensors*.⁹⁰

A qualidade das projeções foi avaliada por meio do coeficiente de Silhueta (S),⁹¹ definido como: $S(i) = \frac{b(i)-a(i)}{\max\{a(i),b(i)\}}$, sendo a(i) a dissimilaridade média do i-ésimo objeto para todos os outros objetos no mesmo agrupamento e b(i) a dissimilaridade média do i-ésimo objeto com todos os objetos no agrupamento mais próximo. Para b(i) > a(i), o denominador será o próprio b(i) e o valor de S será um número positivo e menor ou igual a 1. Para a(i) > b(i), o denominador será o próprio a(i) e o valor de S será um número negativo e maior ou igual a -1. Dessa forma, a solução da equação gera valores entre $-1 \leq S \leq 1$ que são classificados da seguinte maneira:

- -1 a 0 significa que nenhuma distinção foi obtida, ou seja, os dados não foram discriminados;
- 0,26 a 0,5 significa que a discriminação dos dados é fraca;
- 0,51 a 1 significa que a discriminação dos dados é forte.

O parâmetro $a(i)$, portanto, fornece a informação do quão diferente é um ponto do mapa de visualização 2D (um espectro SERS) em relação aos demais pontos do mesmo agrupamento. Quanto maior o valor de $a(i)$ em relação à $b(i)$, mais dispersos serão os pontos de um mesmo agrupamento, dificultando a discriminação entre os diferentes agrupamentos de pontos. Nesse caso, cada agrupamento corresponde à um conjunto de 100 espectros SERS em uma determinada concentração de R6G.

O parâmetro $b(i)$, por sua vez, fornece a informação do quão diferente é um ponto em relação a todos os pontos do agrupamento mais próximo no mapa 2D. Quanto maior o valor de $b(i)$ em relação a $a(i)$, maior será a discriminação entre os diferentes agrupamentos de espectros SERS.

Neste procedimento, a totalidade dos espectros (1100 a 1700 cm^{-1} para a R6G e 530 a 1600 cm^{-1} para o Tiram) é empregada na análise, sem a necessidade de pesquisar ou selecionar bandas. Os espectros são dimensionalmente reduzidos de 446 pontos para 1 ponto no mapa 2D (para a R6G) e de 799 pontos para 1 ponto no mapa 2D (para o Tiram) com o algoritmo *Fastmap*, e as dissimilaridades entre as amostras foram calculadas usando o índice de *Jaccard*.

5 Resultados e discussões

5.1 Caracterização dos microcanais em Si (100)

O processo de microfabricação de canais no substrato de Si foi otimizado para obter canais com boa uniformidade de parede e mesma espessura, na ordem de nanômetros, ao longo do comprimento dos canais. As Figuras 16 (a-f) exibem as imagens dos substratos com canais adquiridos durante o processo AWE. As Figuras 16 (a, b) correspondem ao substrato após o processo RIE, antes de iniciar o processo AWE. Nesta etapa, o canal exibiu uma profundidade de 2 μm , indicando que a máscara de SiO_2 nas regiões padronizadas foi completamente corroída durante o processo RIE. As Figuras 16 (c, d) correspondem à AWE do substrato com 2 min de duração. As Figuras 16 (e, f) correspondem ao substrato após 4 min de corrosão.

As imagens confocais da Figura 16 mostram que, após 4 min de corrosão AWE, os microcanais em forma de V foram obtidos como desejado. Foi observado que na medida em que o Si é corroído, aparecem regiões mais escuras nas imagens 2D [Figura 16 (b, d, f)]. Isto acontece devido à reflexão da luz pelos canais inclinados num ângulo de $54,7^\circ$ [ângulo entre os planos (100) e (111) do cristal de Si] que impossibilita que a luz seja direcionada ao detector.⁹² Dessa forma, a imagem 2D da Figura 16 (f) fornece indícios de que o microcanal em forma de V foi obtido.

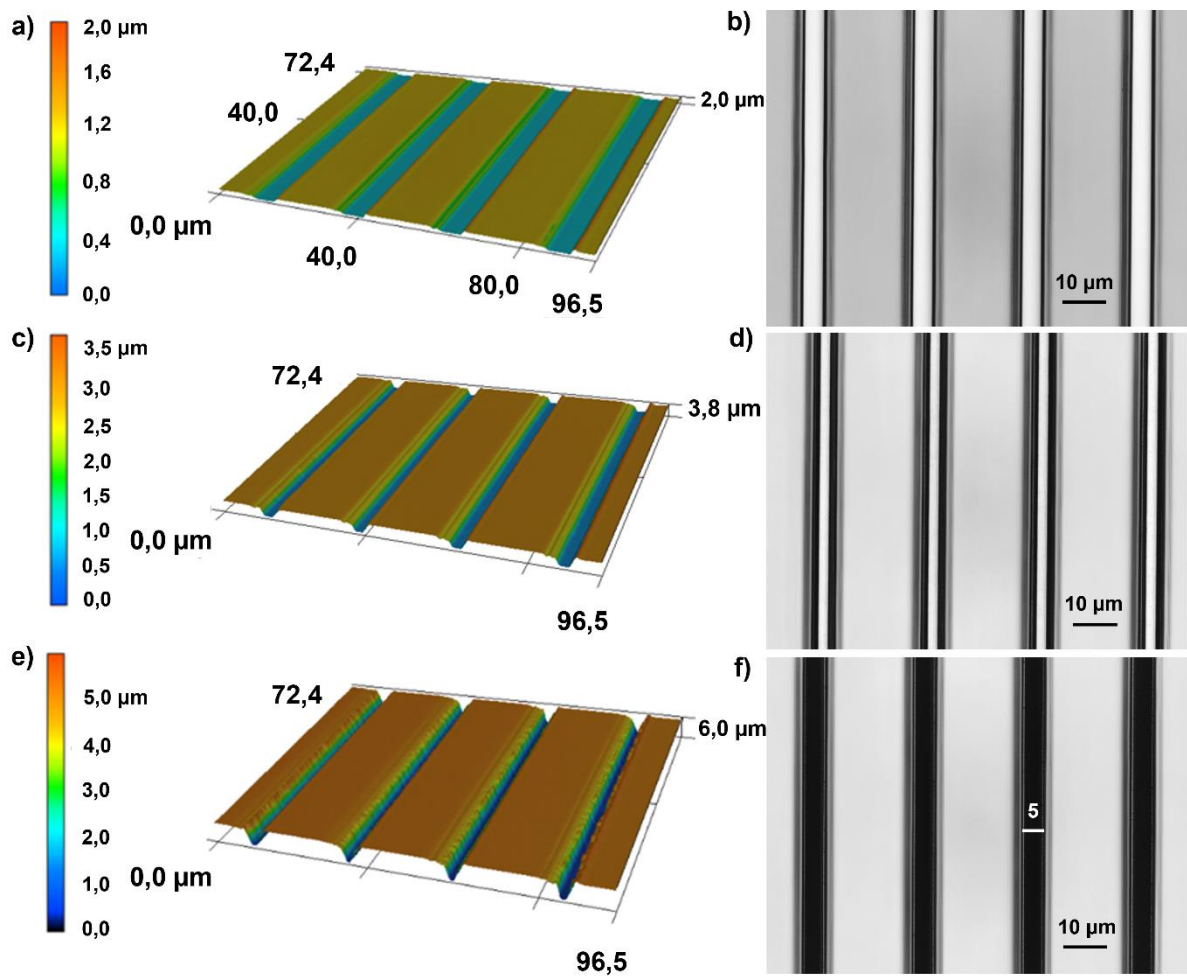


Figura 16. Imagens confocais tridimensionais e bidimensionais adquiridas durante o monitoramento do processo AWE. (a, b) Antes do processo AWE; (c, d) Após 2 min do processo AWE; (e, f) Após 4 min do processo AWE. Adaptada de Bär *et al.*⁸

A distância entre as bordas de um mesmo microcanal foi projetada para ser de cerca de $4 \mu\text{m}$. A profundidade dos microcanais obtida foi de cerca de $6,0 \mu\text{m}$ ($2 \mu\text{m}$ de SiO_2 corroído por RIE e $4 \mu\text{m}$ de Si corroído por AWE). O tempo necessário para obter os microcanais em forma de V no Si está diretamente relacionado ao tamanho da área de superfície exposta.⁹³ Portanto, a distância entre as bordas foi projetada para um processo de corrosão mais rápido, levando a um menor consumo de KOH e mantendo a qualidade das paredes. Além disso, a distância entre os microcanais foi projetada para que a caracterização por espectroscopia Raman propiciasse a análise de apenas um microcanal, sem a interferência de outros.

A qualidade dos microcanais foi verificada por imagens de AFM [Figura 17(a)] e SEM [Figura 17 (b)]. Os microcanais em forma de V exibiram uma excelente uniformidade e paredes com poucos defeitos.

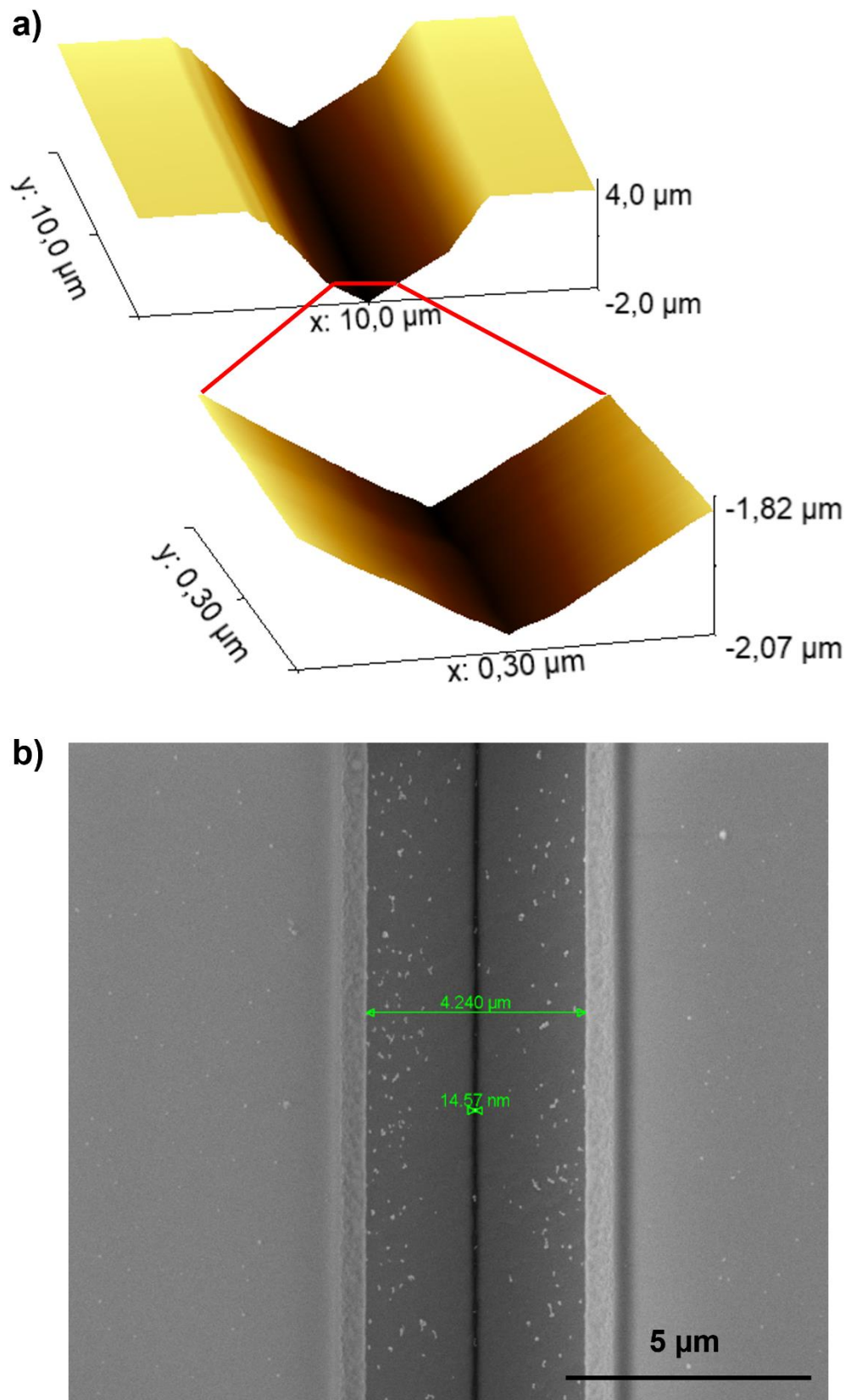


Figura 17. Imagem de (a) AFM e (b) SEM para um microcanal em forma de V de um substrato fabricado nesse trabalho.

Como pode ser observado na imagem de AFM da Figura 17 (a), a área percorrida pela ponteira do AFM foi de $10 \times 10 \mu\text{m}$. A partir da média dos ângulos, que puderam ser obtidos por meio do trajeto realizado pela ponteira, foi possível determinar o ângulo experimental entre os planos (111) e (100) do Si que foi de $53,76^\circ$. Este valor está bem próximo ao descrito pela literatura ($54,7^\circ$),⁹⁴ comprovando a eficiência do método de corrosão anisotrópica úmida. Sabendo o ângulo entre os planos do Si e considerando que a ponteira é uma esfera com raio de 10 nm, foi possível estimar, por meio de relações trigonométricas, a distância aproximada que a ponteira ocupa no fundo do microcanal. Analisando também, a distância que a ponteira percorre e somando estas duas distâncias, é possível obter o valor da largura no fundo do microcanal. Nesse caso, o valor calculado da distância que a ponteira ocupa foi de 10 nm e a distância que ela percorreu foi de 2 nm. Portanto, a largura estimada no fundo do microcanal foi de aproximadamente 12 nm.

Na imagem de SEM da Figura 17 (b) foi observada a existência de alguns pontos brancos, que podem ser associados às impurezas contidas na solução de KOH ou à resíduos de SiO_2 após o processo de corrosão anisotrópica úmida. Dessa forma, após a obtenção dos microcanais em forma de V, foi necessário realizar a limpeza dos substratos em uma solução de HF 1% v/v. Além disso, os substratos com e sem microcanais em forma de V na presença de AuNRs passaram por um processo de limpeza após as análises de SERS, conforme descrito na seção 4.3.3, página 50.

Na figura 18 (a-d) pode-se observar que o processo de limpeza foi eficaz, sem danificar os microcanais fabricados, de forma que eles podem ser reutilizados em vários testes de deposição de AuNRs. Além disso, a imagem de SEM mostrou que a largura no fundo do microcanal foi de cerca de 15 nm [Figura 18(d)] e a distância entre as bordas de um mesmo microcanal foi de cerca de $4,5 \mu\text{m}$ [Figura 18(c)]. O valor da largura no fundo do canal observado nas imagens de SEM está próximo do valor estimado anteriormente por AFM. A reutilização desses substratos sem danificação dos microcanais é importante para manter a qualidade na preparação dos substratos SERS.

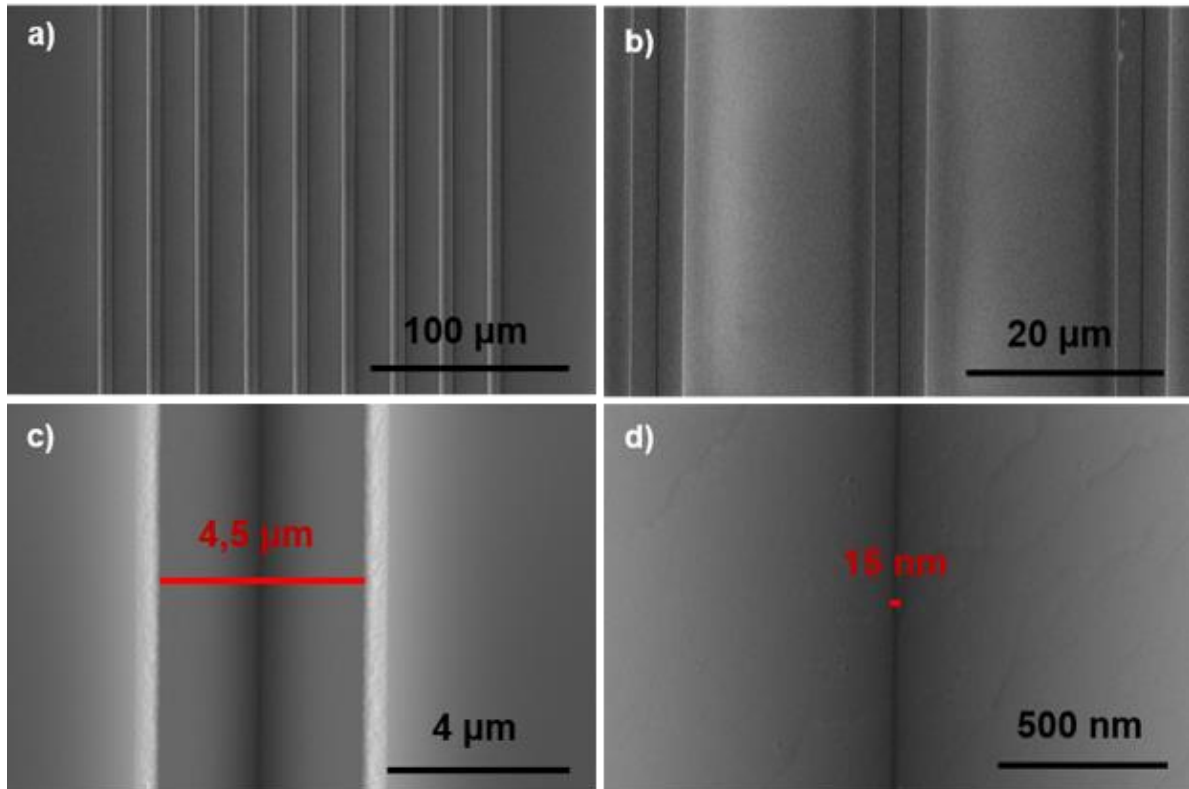


Figura 18. (a-d) Microscopia SEM para substratos de Si com microcanais em forma de V em diferentes ampliações após o processo de limpeza para a sua reutilização. Adaptada de Bär *et al.*⁸

5.2 Espalhamento Raman em Si com e sem microcanais

Substratos de Si com e sem microcanais, na ausência de AuNRs foram analisados por meio da espectroscopia Raman, tomando como base a banda do Si em torno de 521 cm^{-1} . Para um monocristal de Si orientado de modo que o plano superior exposto corresponde ao (100), essa banda é denominada LO.⁹⁵ A Figura 19 mostra os espectros Raman médios do Si e seus respectivos desvios padrão, na região dessa banda, para os substratos com e sem microcanais em forma de V.

Um aumento de 2 vezes na intensidade do espectro Raman foi verificado para o substrato com microcanais comparado ao sem microcanais. Além disso, a Figura 20 mostra 25 espectros Raman pontuais em diferentes regiões do substrato com microcanais em forma de V, onde foi observado um aumento de intensidade na banda LO tanto dentro dos microcanais quanto nas suas vizinhanças, comparado à região plana distante dos microcanais.

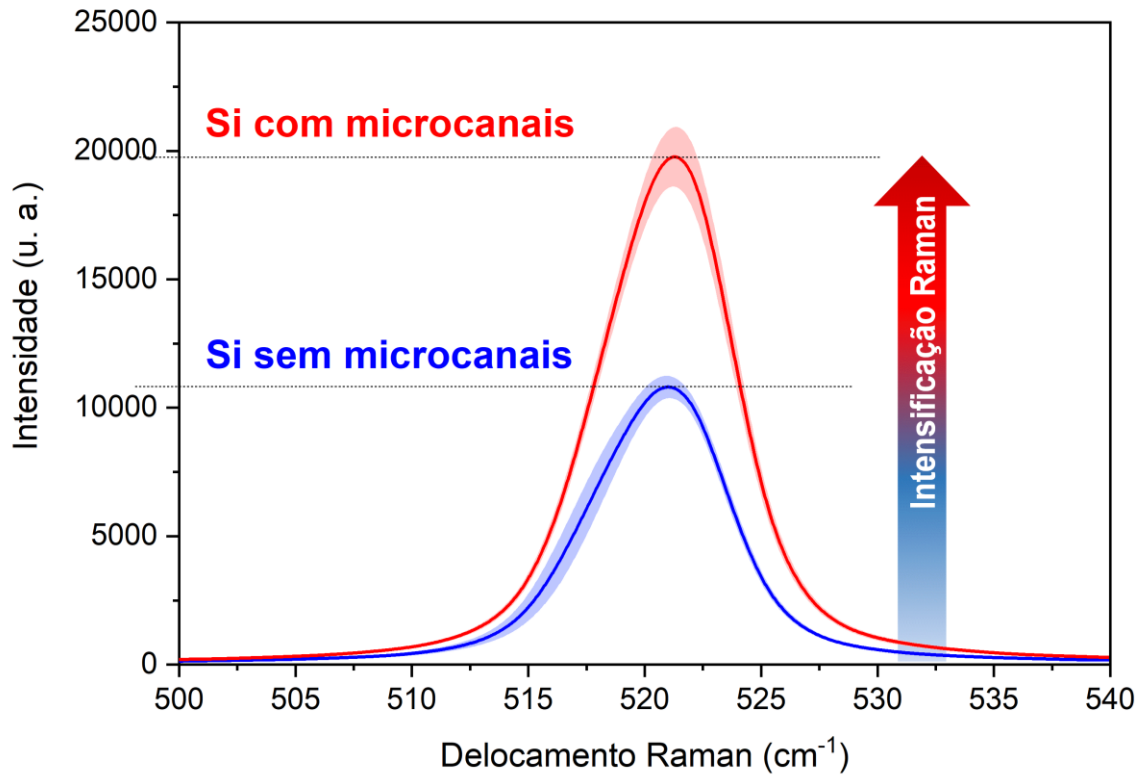


Figura 19. Média e desvio padrão para 20 espectros Raman do Si em cada substrato (com e sem microcanais em forma de V) monitorados pela banda referente ao modo LO em 521 cm^{-1} . Adaptada de Bär *et al.*⁸

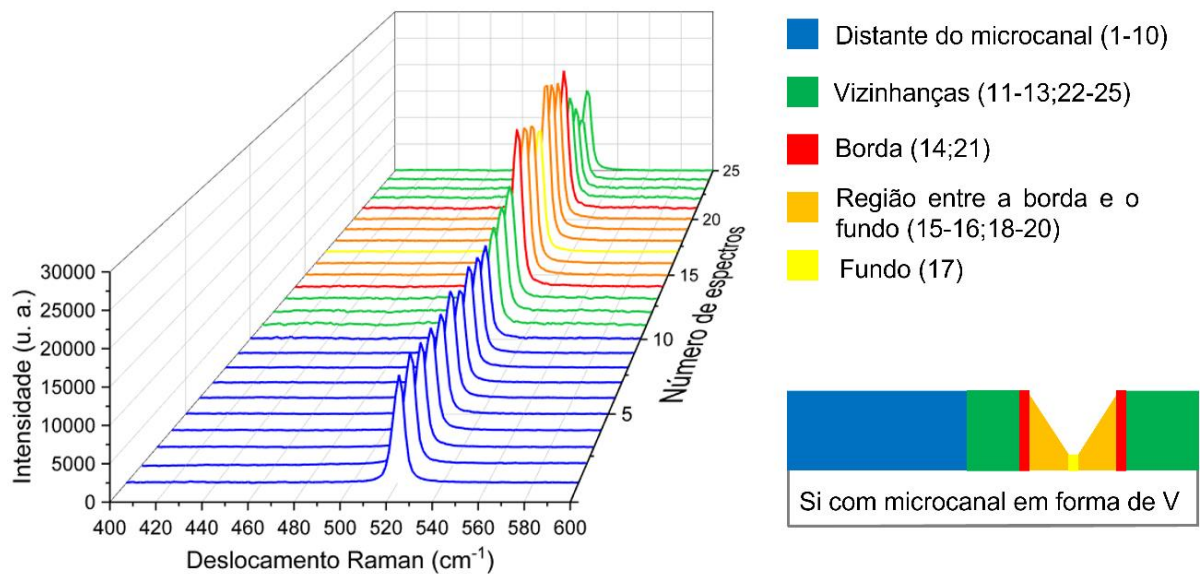


Figura 20. Espectros Raman para substrato com microcanal em forma de V em diferentes regiões monitoradas pela banda LO do Si em 521 cm^{-1} , usando laser de comprimento de onda de 633 nm, com tempo de exposição de 10 s e 1 acc. Adaptada de Bär *et al.*⁸

Um aumento de intensidade ainda maior, de cerca de 4 vezes, foi observado para o espectro Raman da molécula sonda R6G (10^{-3} mol L $^{-1}$) no substrato com microcanais em comparação ao sem microcanais, ambos na ausência de AuNRs. Esse maior aumento na intensidade Raman para a R6G comparado ao aumento de intensidade do modo LO do Si no substrato com microcanais pode estar relacionado à possibilidade de confinamento das moléculas de R6G dentro dos microcanais, o que aumentaria o número de espalhadores por área irradiada. A Figura 21 mostra o conjunto de 100 espectros da R6G para cada substrato (com e sem microcanais) e as respectivas médias e desvios padrão.

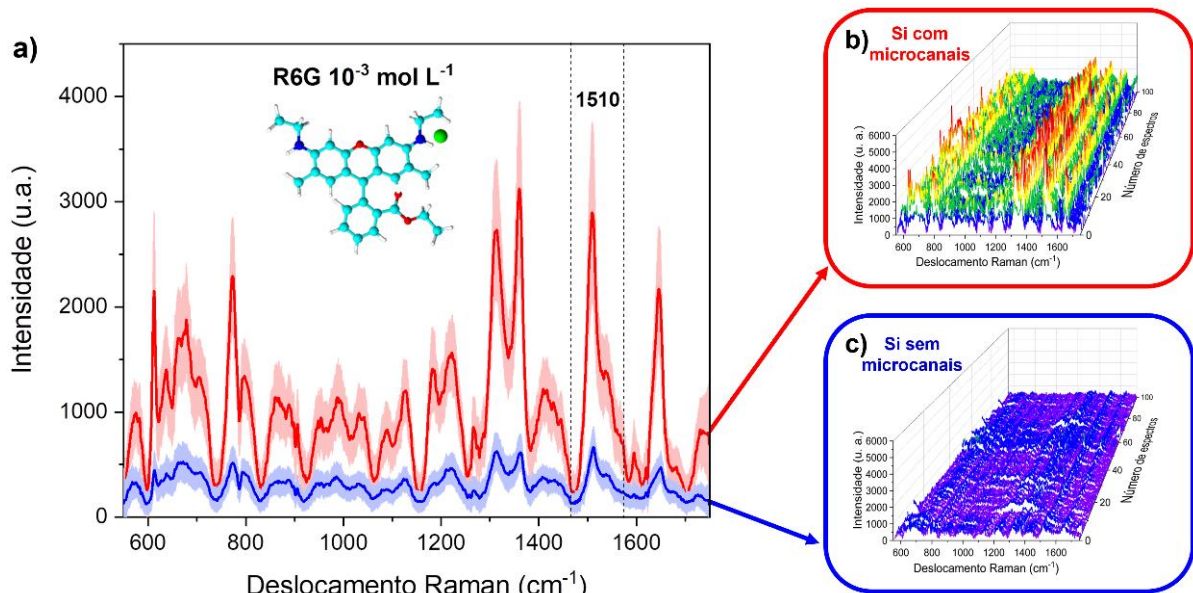


Figura 21. (a) Espectros Raman médios e desvios padrão da solução 10^{-3} mol L $^{-1}$ de R6G nos substratos com (espectro vermelho) e sem (espectro azul) microcanais em forma de V. (b, c) Conjunto de 100 espectros Raman da R6G adquiridos para os substratos com e sem microcanais em forma de V. Todas as análises foram realizadas com laser de 633 nm, tempo de exposição de 1 s e 1 acc. Adaptada de Bär *et al.*⁸

Além do confinamento das moléculas nos microcanais, este aumento na intensidade Raman pode estar diretamente relacionado à presença de microcanais em forma de V no Si. A partir das referências encontradas sobre o aumento de intensidade Raman da banda referente ao modo LO do Si,^{81,82,84} não foi encontrada a explicação para se observar esse aumento em microcanais em forma de V como os obtidos nesse trabalho. Para tentar entender o fenômeno responsável pelo aumento da intensidade Raman observada nos substratos com microcanais em forma de V, cálculos por elementos finitos do campo elétrico espalhado pelos substratos de Si foram realizados, uma vez que a intensidade do espectro Raman é diretamente

proporcional à intensidade do campo elétrico da radiação incidente.⁹⁶ A Figura 22 (a) mostra a seção transversal da amostra considerada na simulação de campo elétrico, isto é, substratos com e sem microcanais em forma de V. Para isso, foi considerada uma onda plana incidente (comprimento de onda de 633 nm), em que a intensidade do campo elétrico espalhado (componente z absoluto) é normalizada pela intensidade do campo elétrico incidente (escala de cores) conforme mostrado na Figura 22 (c, d) para ambas as estruturas de substratos.

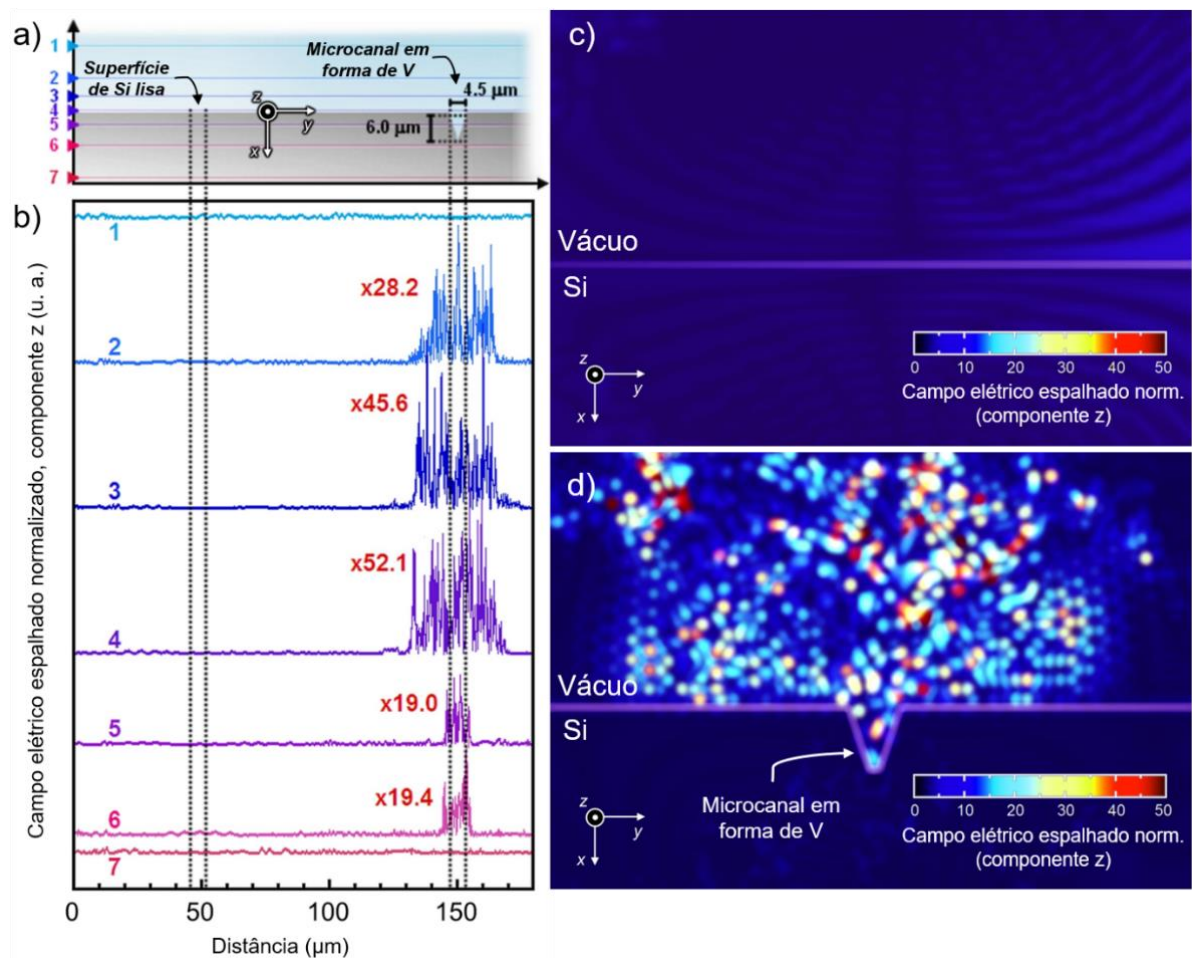


Figura 22. Simulação por elementos finitos do campo elétrico espalhado pelos substratos e intensidade de espalhamento Raman nos substratos (a) Seção transversal da estrutura da amostra usada na simulação. (b) Campo elétrico espalhado normalizado (componente z) ao longo das linhas de perfil 1-7 da imagem (a). Campo elétrico (normalizado pela intensidade do campo elétrico de entrada) espalhado pelo (c) substrato sem microcanais e (d) substrato com microcanais em forma de V. Adaptada de Bär *et al.*⁸

Na Figura 22 (c, d), os locais com máxima intensificação de campo elétrico espalhado podem ser observados na região do microcanal em forma de V e suas vizinhanças, onde mais padrões de interferência da propagação do campo elétrico espalhado são gerados. Como resultado, um aumento na intensidade do espectro

Raman ocorrerá nessas regiões de interferência construtiva, corroborando os resultados experimentais mostrados nas Figuras 19, 20 e 21. Para melhor compreender como esses padrões de interferências podem variar dependendo da região do substrato de Si com microcanais em forma de V, a Figura 22 (b) exibe os perfis de campo elétrico espalhado absoluto obtidos ao longo das linhas 1-7, inicialmente traçados na Figura 22 (a). As linhas de perfil mostram que a interferência de campo espalhado permeia todo o espaço ao redor do microcanal em forma de V, incluindo a região plana próxima ao microcanal. A influência efetiva do microcanal no campo espalhado pode ser avaliada quantitativamente junto com a intensificação mostrada pelos perfis 2-6 na Figura 22 (b).

O cálculo mostrou que, em média, a intensificação do campo elétrico pode chegar em até 50 vezes a intensidade da radiação incidente na vizinhança do microcanal em forma de V. No entanto, para ser uma região de alta intensidade para o espectro Raman, a intensificação do campo elétrico deve ocorrer próximo à superfície do substrato.⁹⁷ Nesse sentido, o microcanal em forma de V pode intensificar o campo elétrico espalhado tanto na superfície do substrato nas proximidades do microcanal quanto no próprio microcanal, conforme demonstrado na linha de perfil 4 na Figura 22 (b) e pelos pontos brilhantes na Figura 22 (d), respectivamente.

Dessa forma, o aumento na intensidade dos espectros Raman foi atribuído aos microcanais em forma de V na superfície do Si. Foi proposto que esse efeito pode ser considerado como um Espalhamento Raman Intensificado Induzido pela Forma (SIERS, da sigla em inglês para *Shape-Induced Enhanced Raman Scattering*), no qual o aumento do espalhamento Raman é garantido pela intensificação do campo elétrico causado por padrões de interferência. Considerando o substrato de Si com microcanais em forma de V, nas regiões onde ocorrem interferências construtivas o campo elétrico espalhado é intensificado em comparação com o substrato sem microcanais.

5.3 Caracterização dos AuNRs

A obtenção de AuNRs foi confirmada pelo espectro UV-vis-NIR (*Ultraviolet-Visibly-Near-Infrared*) exibindo duas bandas características em 517 e 715 nm (Figura 23), correspondendo às bandas de ressonância plasmônica transversal e longitudinal, respectivamente. Além disso, a caracterização por TEM revela uma excelente uniformidade de distribuição de tamanho, com um tamanho médio de 56 ± 9 nm e 19 ± 2 nm para comprimento e largura, respectivamente (Figura 24).

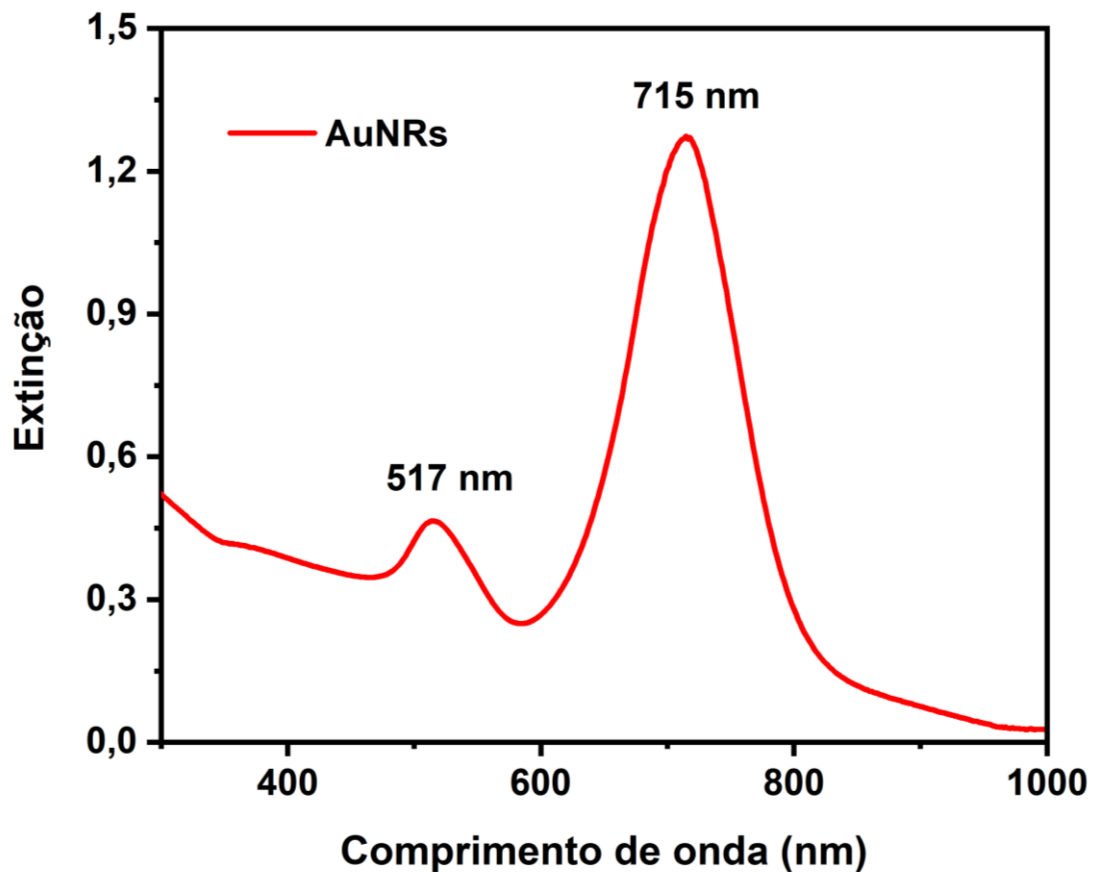


Figura 23. Espectro de extinção em função do comprimento de onda para suspensão coloidal de AuNRs obtido em um equipamento de espectroscopia de absorção UV-vis-NIR. Adaptada de Bär *et al.*⁸

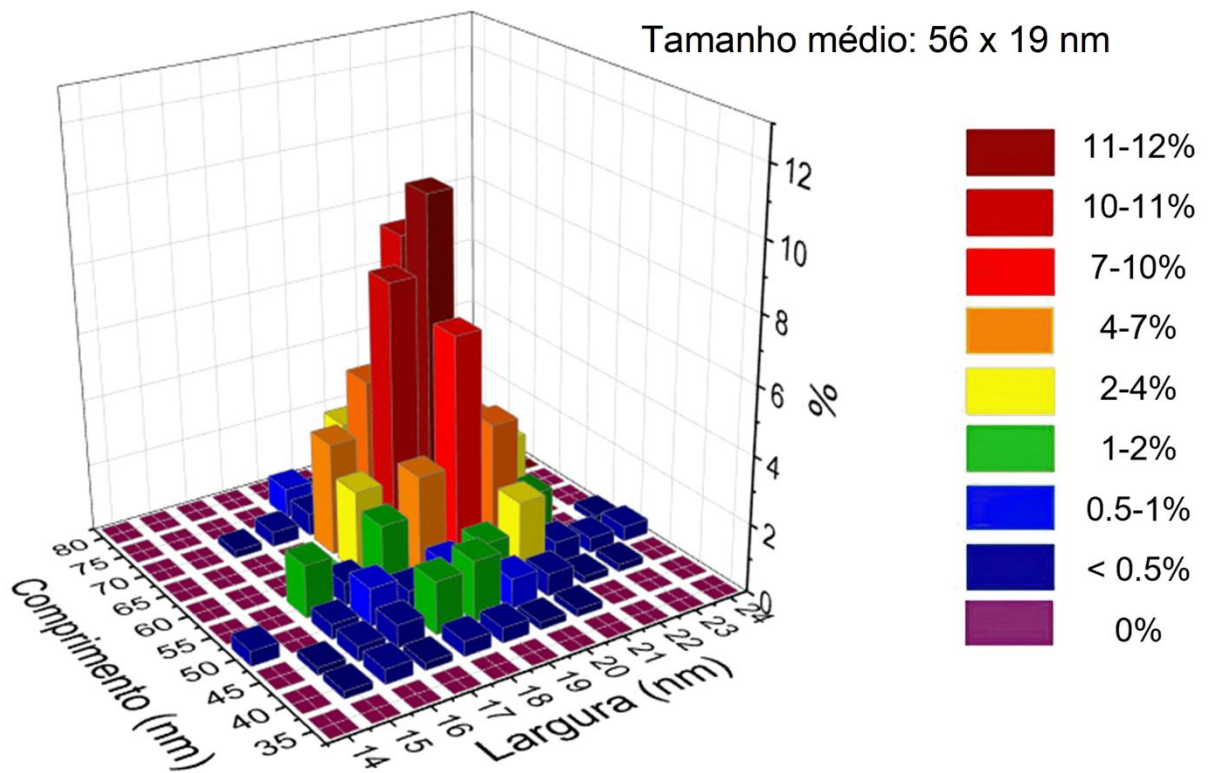
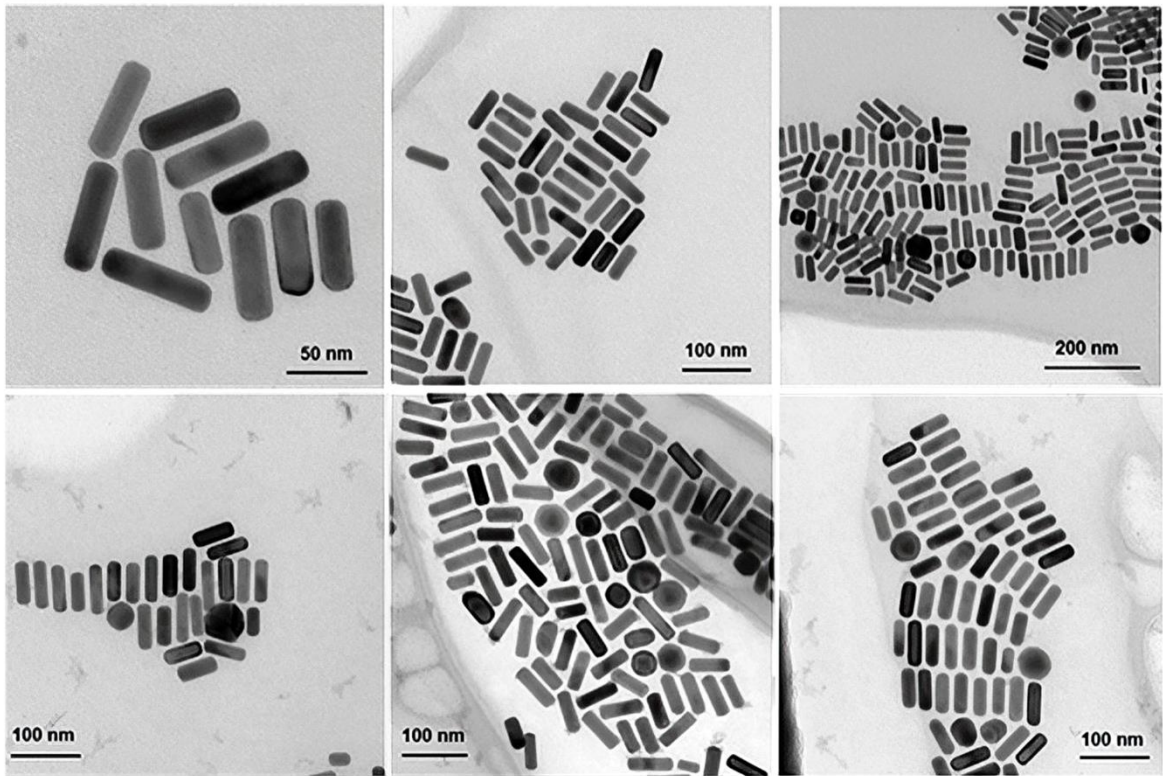


Figura 24. Imagens de TEM dos AuNRs e gráfico de distribuição de tamanho de partícula. Adaptada de Bär *et al.*⁸

Após a caracterização da suspensão coloidal de AuNRs, substratos SERS com e sem microcanais em forma de V foram fabricados pelo método de deposição por gotejamento com inclinação de 5° dos substratos.

5.4 Caracterização dos substratos SERS

Substratos SERS com e sem microcanais em forma de V foram obtidos, no qual diversos arranjos de AuNRs foram encontrados em diferentes regiões dos substratos (Figura 25 e 26). Para os substratos sem microcanais, foram encontradas estruturas 3D de AuNRs na região próxima à borda da gota. O efeito que favorece a formação destas estruturas é conhecido como *coffee ring*.⁹⁸ Já na região mais próxima ao centro da gota e arredores foram observados AuNRs organizados majoritariamente lado a lado na posição horizontal e alguns organizados lado a lado na posição vertical.

O efeito do solvente utilizado durante o processo de deposição influenciou na obtenção de organizações lado a lado dos AuNRs.⁶⁴ A adição de álcool isopropílico provavelmente foi responsável pela remoção de CTAB das laterais dos AuNRs induzindo, dessa forma, a interação lado a lado entre os AuNRs. A Figura 25 (a-f) mostra imagens de SEM em diferentes regiões de um substrato SERS sem microcanais.

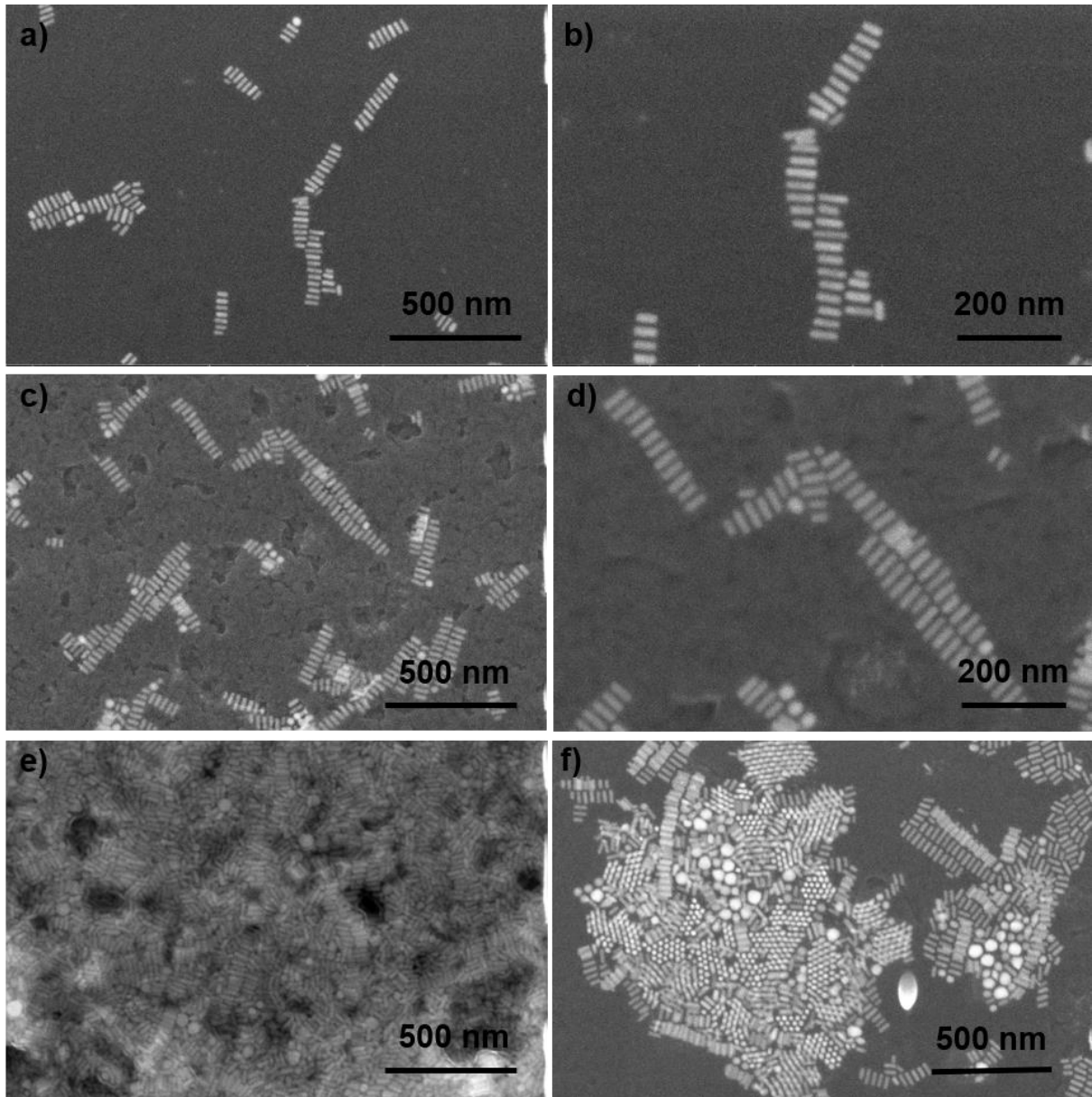


Figura 25. Imagens de SEM para substratos SERS sem microcanais em diferentes regiões. (a-d) AuNRs organizados lado a lado, (e) agregados 3D de AuNRs e (f) algumas organizações de AuNRs lado a lado tanto na posição vertical quanto horizontal. Adaptada de Bär *et al.*⁸

Em substratos SERS com microcanais em forma de V também foram encontrados diferentes arranjos de AuNRs conforme a região do substrato. Próximo às extremidades dos microcanais estruturas 3D foram encontradas. Na região média dos microcanais A-D, próxima ao quadrado de referência, foram encontradas várias organizações lado a lado de AuNRs. Já nos microcanais localizados exatamente ao centro do substrato SERS com microcanais em forma de V (I-Q), muitos alinhamentos ponta a ponta entre AuNRs foram encontrados. A Figura 26 (a-f) mostra imagens de SEM das organizações ponta a ponta, lado a lado e 3D dos AuNRs.

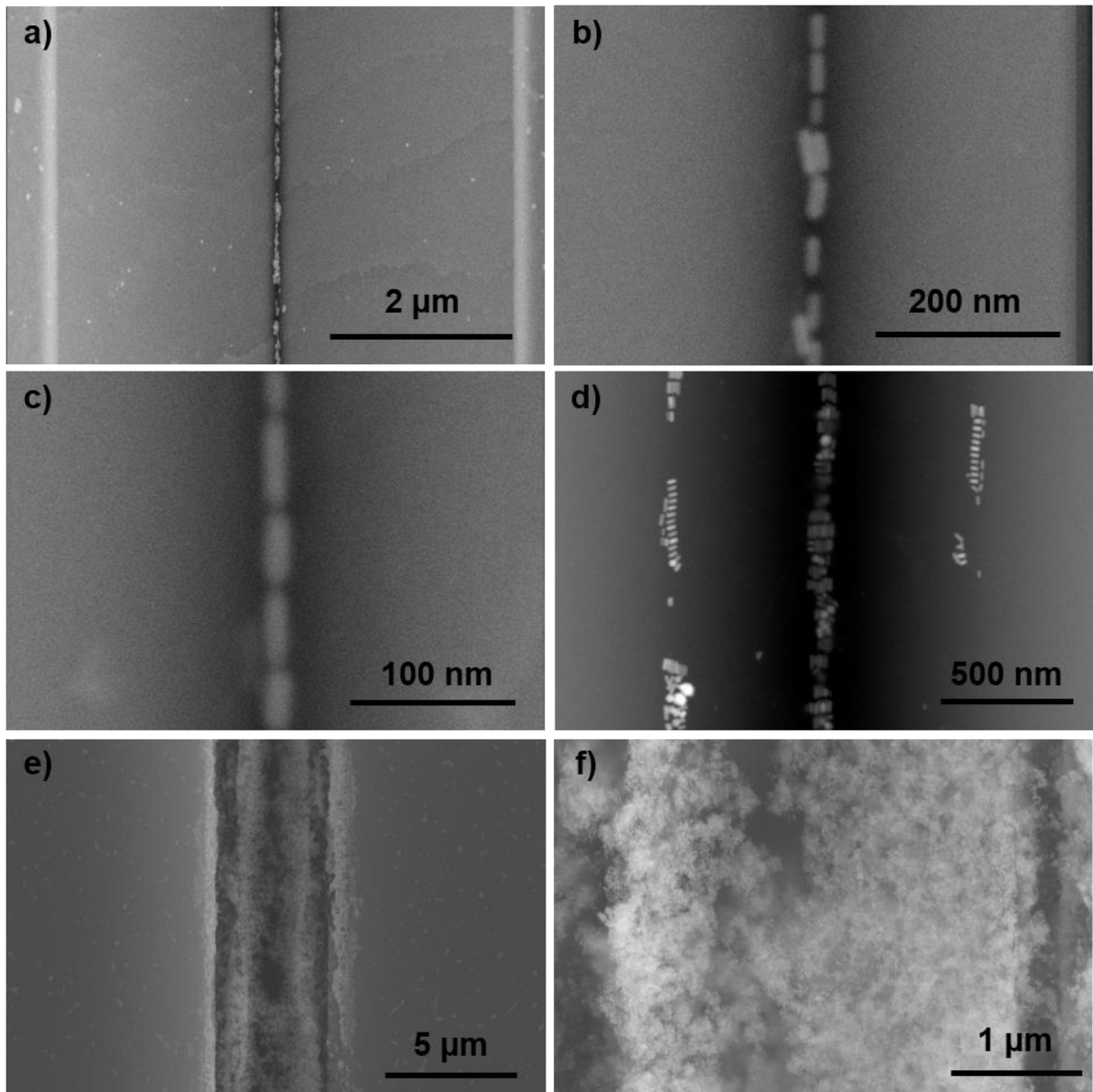


Figura 26. Imagens de SEM para substratos com microcanais em forma de V na presença de AuNRs em diferentes regiões. (a-c) AuNRs organizados ponta a ponta no fundo do microcanal (centro do substrato), (d) AuNRs organizados lado a lado nas paredes e no fundo do canal (lateral do substrato na altura do quadrado de referência) e (e, f) agregados 3D de AuNRs (extremidades dos microcanais).

O alinhamento ponta a ponta entre AuNRs foi encontrado em várias regiões do centro dos substratos SERS com microcanais e ocorreu provavelmente devido à largura de 15 nm no fundo dos microcanais em forma de V ser semelhante à largura dos AuNRs (19 nm). Além disso, a inclinação do substrato SERS com microcanais durante a deposição também pode ter influenciado na formação desses alinhamentos, bem como das estruturas 3D nas extremidades dos microcanais. A posição inclinada

favoreceu o fluxo da suspensão coloidal de AuNRs para o fundo dos microcanais por meio de forças capilares.⁷¹

Além do álcool isopropílico influenciar na organização lado a lado dos AuNRs, na horizontal, para ambos os substratos, no caso dos substratos SERS com microcanais em forma de V esse solvente teve contribuição importante para a entrada dos AuNRs nos microcanais, conforme mostra a Figura 27 (a, b). Além disso, foi observado nesta região do substrato que os AuNRs não permaneceram na superfície lisa, mas apenas dentro dos microcanais. Já na Figura 26 (e) foi observado que alguns pequenos aglomerados de AuNRs se encontram na superfície lisa do Si, fora dos microcanais, provavelmente devido ao excesso de AuNRs nesta região (extremidade do microcanal com relação ao seu comprimento).

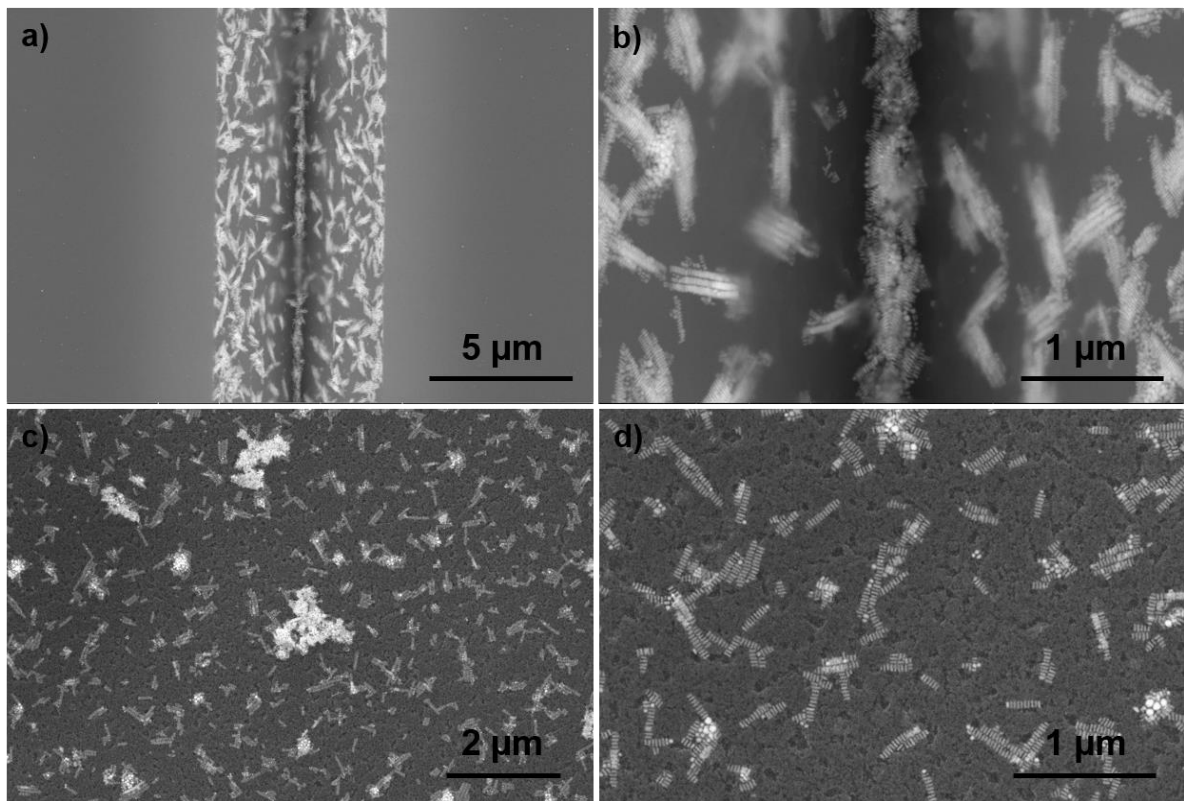


Figura 27. Imagens de SEM de AuNRs em substratos SERS com (a, b) microcanais e sem (c, d) microcanais. Adaptada de Bär *et al.*⁸

Todas as imagens de SEM dos substratos SERS mostradas nessa seção foram realizadas após as aquisições dos espectros Raman da R6G. É importante ressaltar que não foi possível sondar por SEM a região exata em que os espectros Raman foram obtidos, mas apenas em regiões próximas, semelhantes às imagens da Figura 27, onde tanto estruturas 3D quanto organizações lado a lado são encontradas. No

caso dos substratos SERS com microcanais em forma de V, as regiões que apresentaram maior resposta SERS foram as próximas das extremidades dos microcanais, com relação aos seus comprimentos, onde várias estruturas 3D foram encontradas nas imagens de SEM e onde foi possível observar, por meio do microscópio confocal acoplado ao espectrômetro Raman, a existência de AuNRs devido ao grande empacotamento 3D. Por esse motivo se optou em explorar mais estas regiões com AuNRs organizados tridimensionalmente em vez das regiões com vários alinhamentos ponta a ponta. Além disso, para que a região com alinhamentos ponta a ponta fosse investigada com maior exatidão, seria necessário o uso de outro equipamento, como um microscópio de força atômica acoplado com um espectrômetro Raman.

5.5 Substratos SERS com e sem microcanais

O desempenho dos substratos com e sem microcanais em forma de V na presença de AuNRs foi avaliado por meio da aquisição de centenas de espectros Raman da molécula sonda R6G em diferentes concentrações. As Figuras 28 (a-c) e 29 (a-g) mostram os mapeamentos SERS da R6G para os substratos SERS sem microcanais e com microcanais em forma de V, respectivamente.

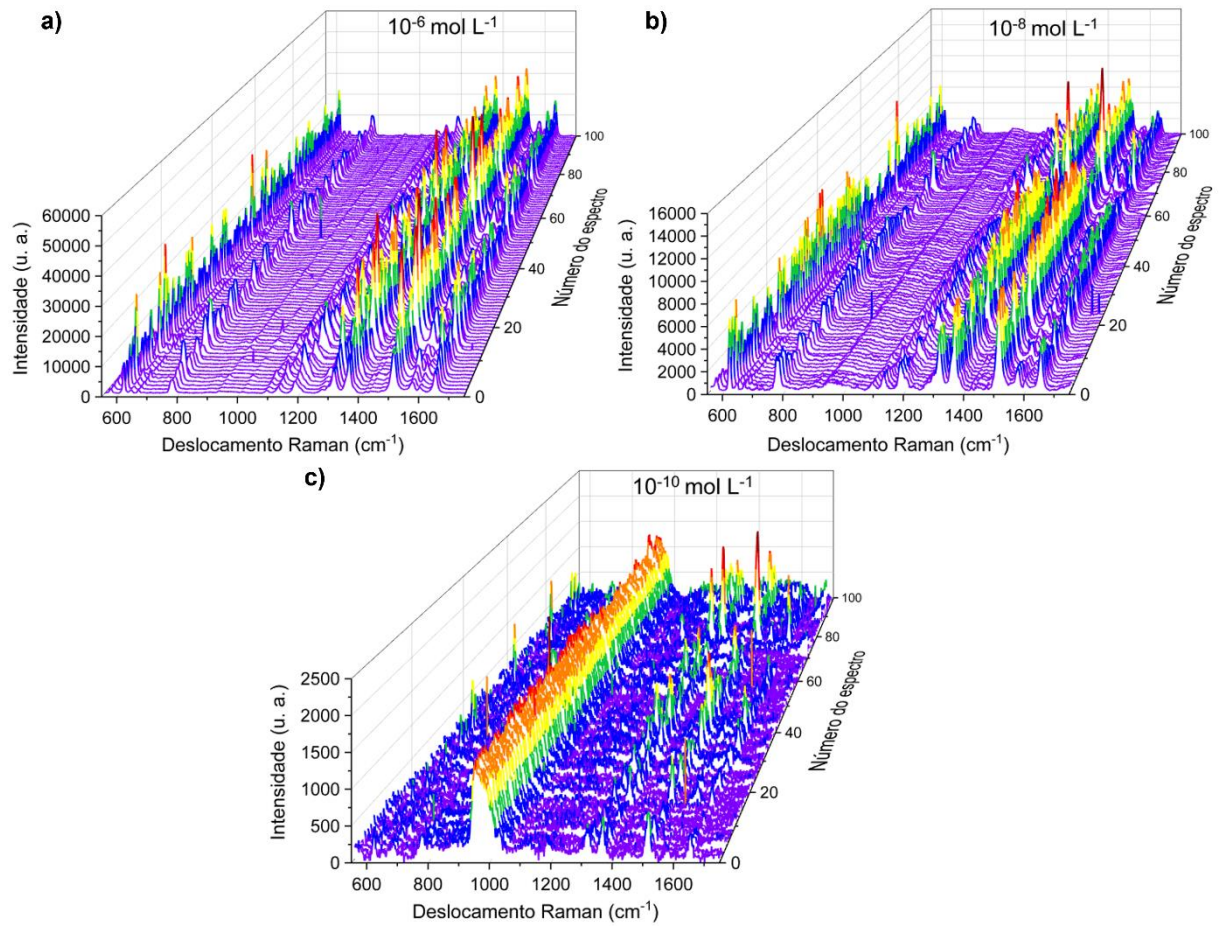


Figura 28. Conjunto de 100 espectros SERS da R6G em diferentes concentrações para substratos SERS sem microcanais. (a) 10^{-6} mol L⁻¹, (b) 10^{-8} mol L⁻¹, e (c) 10^{-10} mol L⁻¹. Adaptada de Bär *et al.*⁸

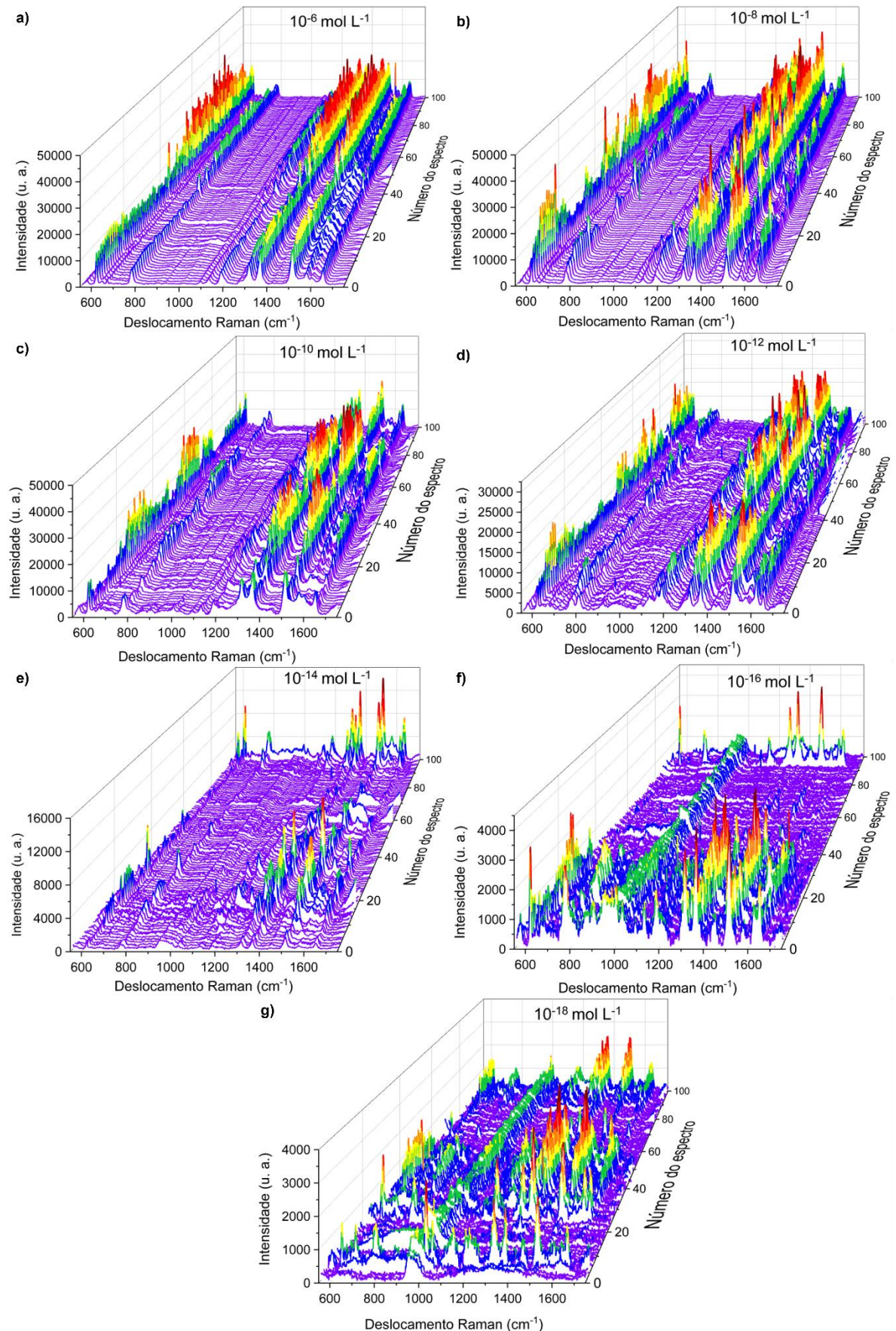


Figura 29. Conjuntos de 100 espectros SERS da R6G em diferentes concentrações, para substratos SERS com microcanais em forma de V. (a) 10^{-6} mol L⁻¹, (b) 10^{-8} mol L⁻¹, (c) 10^{-10} mol L⁻¹, (d) 10^{-12} mol L⁻¹, (e) 10^{-14} mol L⁻¹, (f) 10^{-16} mol L⁻¹, e (g) 10^{-18} mol L⁻¹. Adaptada de Bär *et al.*⁸

Para cada concentração de R6G são apresentados 2 mapeamentos de 50 pontos, totalizando 100 espectros, sendo que cada mapeamento foi realizado em um microcanal diferente de um mesmo substrato SERS. Para as menores concentrações de R6G foi observada a banda referente ao modo óptico transversal de segunda ordem (2TO) do Si, na região de 965 cm^{-1} .⁹⁹ A razão dessa banda não ser observada nas maiores concentrações de R6G é a elevada intensidade das bandas da R6G para os substratos SERS com e sem microcanais. O espectro SERS da R6G, é caracterizado pelas bandas apresentadas na Tabela 3 com suas respectivas atribuições.

Tabela 3. Atribuição de bandas da R6G observadas nos espectros SERS.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Espectro SERS (cm^{-1})	Atribuições^a
612	$\delta(\text{C}-\text{C})$ no plano do anel em anéis de xanteno/fenil
772	$\delta(\text{C}-\text{H})$ fora do plano
1126	$\delta(\text{C}-\text{H})$ no plano em anéis de xanteno/fenil
1182	$\delta(\text{C}-\text{H})$ no plano no anel de xanteno
1312	modo híbrido de anéis xanteno/fenil com o grupo NHC_2H_5
1362	$\nu(\text{C}-\text{C})$ dos anéis de xanteno
1511	$\nu(\text{C}-\text{C})$ dos anéis de xanteno
1573	$\nu(\text{C}=\text{C})$ no anel fenil
1597	modo híbrido de anel fenil com o grupo COOC_2H_5
1648	$\nu(\text{C}=\text{C})$ dos anéis de xanteno

ν = estiramento; δ = deformação angular

Para o caso do uso de substratos SERS contendo nanopartículas de ouro (AuNPs, da sigla em inglês para *Gold Nanoparticles*), já foi observado que a alteração nas frequências (valores de deslocamento Raman) da R6G no espectro SERS não é significativa quando se compara com o espectro Raman normal.^{103,104} Isso sugere que a contribuição do mecanismo químico pode ser desconsiderada na intensificação dos

espectros SERS da R6G. Nesse caso, uma fraca interação entre a R6G e a superfície é sugerida, devido à presença do surfactante CTAB na superfície dos AuNRs, responsável pela repulsão eletrostática da R6G. No entanto, durante a preparação dos substratos SERS desenvolvidos nesse trabalho, uma das etapas é a adição de álcool isopropílico para facilitar a entrada dos AuNRs dentro dos microcanais em forma de V. Com isso, parte do CTAB provavelmente é removido da superfície, o que explica a ausência de ruído de fundo nos espectros SERS da R6G. Como consequência, uma atração eletrostática entre a R6G e os AuNRs pode ocorrer, uma vez que o Br⁻ do CTAB permanece na superfície.¹⁰⁵ Como a superfície dos AuNRs pode apresentar uma distribuição de carga negativa, a R6G, que apresenta carga positiva, interage eletrostaticamente com essa superfície.

A Figura 30 (a, b) mostra os espectros SERS médios da R6G na faixa de concentração de 10^{-6} a 10^{-18} mol L⁻¹ para os substratos SERS com microcanais em forma de V e na faixa de concentração de 10^{-6} a 10^{-10} mol L⁻¹ para os substratos SERS sem microcanais, respectivamente. A menor concentração de R6G detectada nos substratos SERS sem microcanais foi de 10^{-10} mol L⁻¹, enquanto os substratos SERS com microcanais em forma de V alcançaram detecção attomolar (10^{-18} mol L⁻¹).

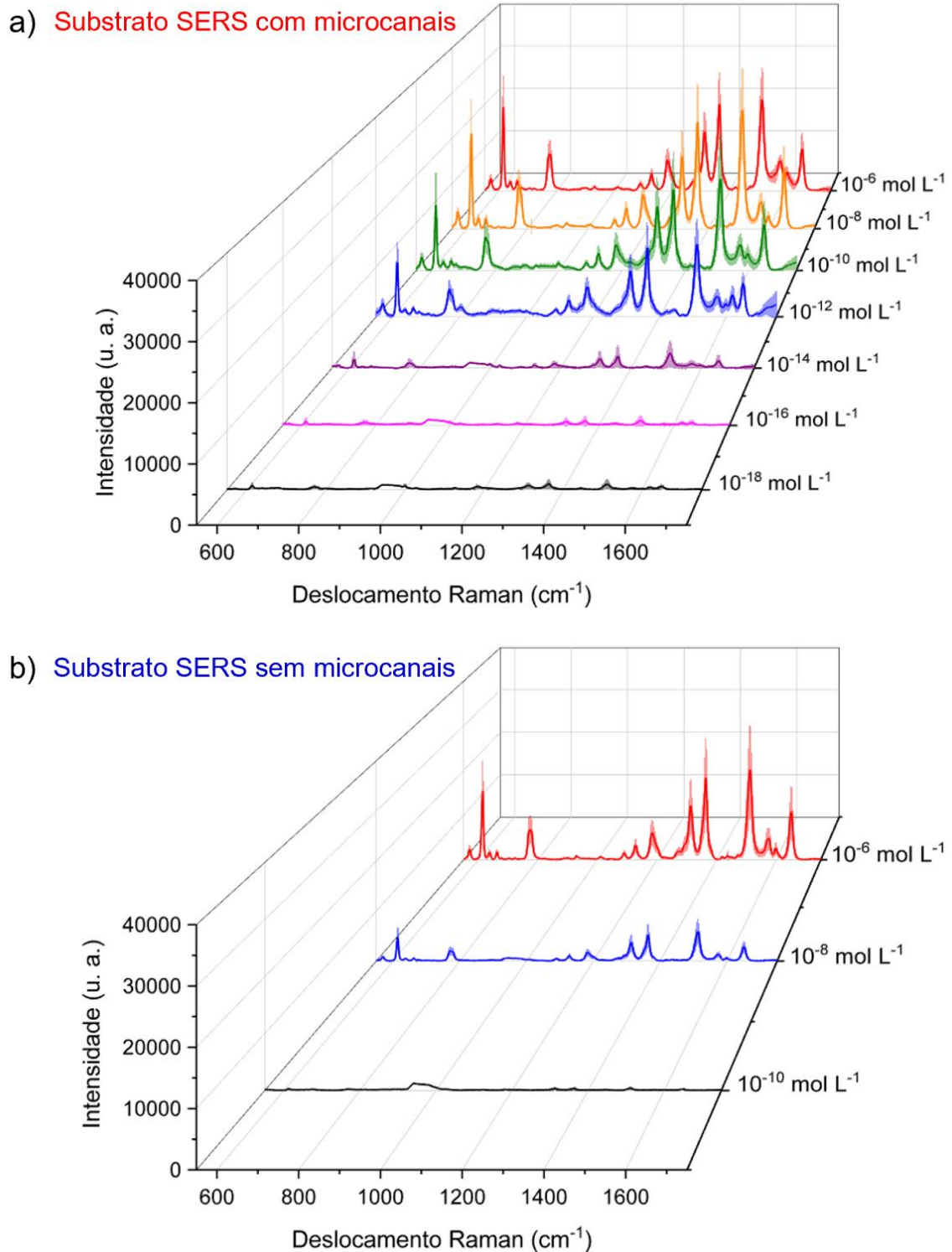


Figura 30. Espectros SERS médios em diferentes concentrações de R6G nos substratos SERS com (a) e sem microcanais em forma de V (b). A linha de sombreado corresponde ao desvio padrão obtido para o conjunto de 100 espectros coletados. Adaptada de Bär *et al.*⁸

Analisar um conjunto de dados muito grande, como é o caso da coleção de centenas de espectros SERS de R6G em várias concentrações diferentes, é uma tarefa bastante complexa. Dessa forma, técnicas de projeção multidimensional

facilitam a visualização de dados multivariados para realização de reconhecimento de padrão.

No gráfico de coordenadas paralelas [Figura 31 (a, b)], tanto os dados brutos quanto os corrigidos (EMSC) são normalizados. Esses dados são referentes aos mapeamentos SERS realizados em substratos com microcanais em diferentes concentrações de R6G (10^{-6} a 10^{-18} mol L⁻¹). Foi observado que para os dados brutos, não há distinção entre as bandas dos espectros. Cada cor do gráfico representa um conjunto de espectros SERS em uma dada concentração de R6G. Após a correção dos efeitos de dispersão pelo método EMSC, os espectros são discriminados e há também uma maior separação entre as diferentes concentrações.

Cada linha vertical do gráfico de coordenadas paralelas representa uma das 446 dimensões que compreende a região espectral entre 1100 e 1700 cm⁻¹ para a R6G. Esses dados foram posteriormente projetados usando cada uma das quatro técnicas de redução dimensional utilizadas nesse trabalho. Para cada projeção multivariada, foi realizado o cálculo do coeficiente de silhueta para os dados brutos e corrigidos. O valor médio do coeficiente de silhueta para cada técnica de projeção pode ser observado no gráfico de barras da Figura 31 (c). Foi observado que para os dados brutos, o coeficiente de silhueta médio foi negativo para todas as técnicas de projeção (-0,025, -0,085, -0,096 e -0,096), o que significa que não há discriminação de amostras.⁹¹ Dessa forma, as diferentes concentrações de R6G não foram discriminadas, como pode ser observado no gráfico IDMAP representado na Figura 32. Cada ponto do mapa de visualização 2D corresponde à um espectro SERS e cada cor corresponde à uma concentração de R6G.

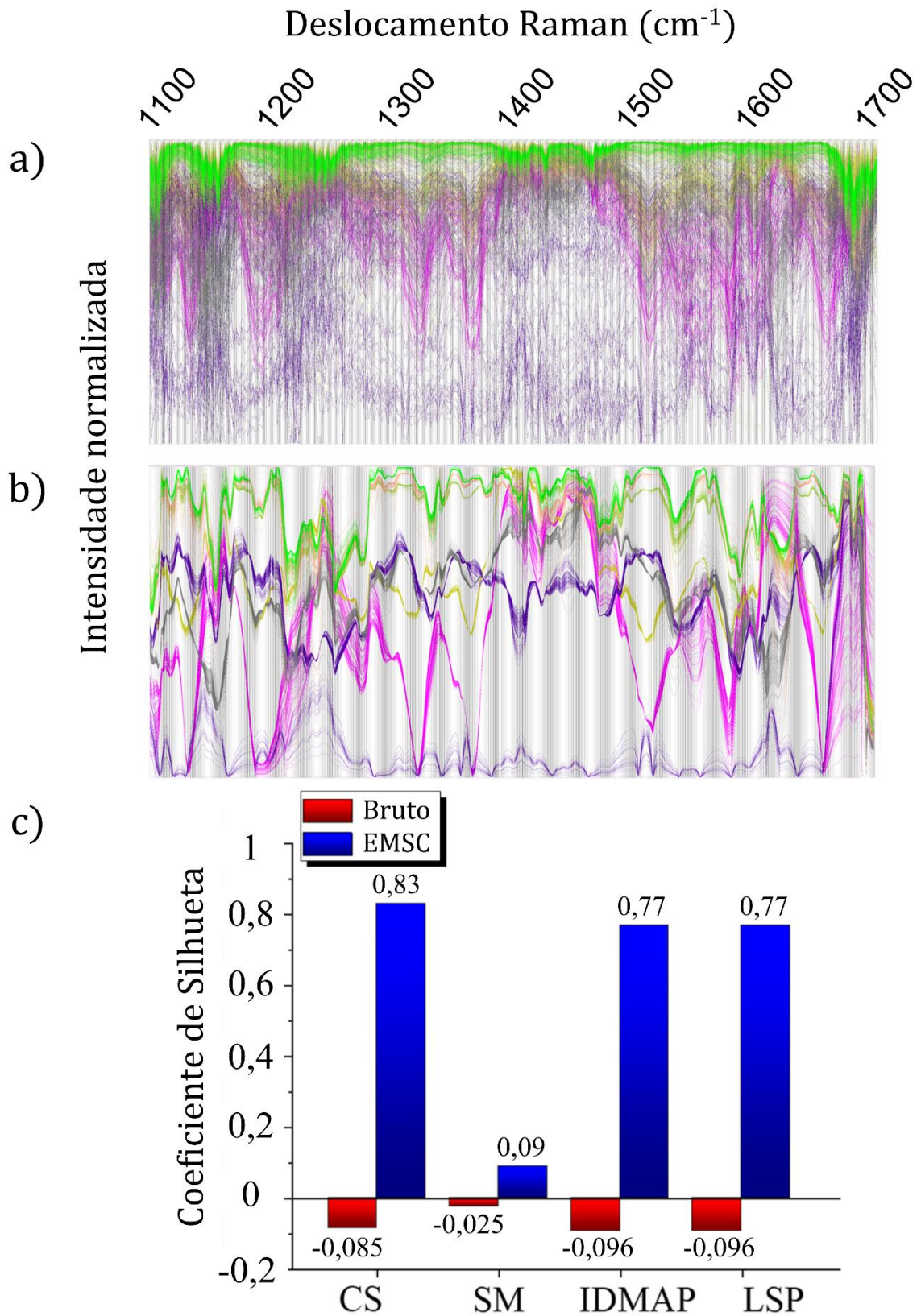


Figura 31. Gráficos de coordenadas paralelas de a) dados brutos e b) dados EMSC. c) Valores dos coeficientes de silhueta calculados para todas as projeções *Classical Scaling* (CS), *Sammon's Mapping* (SM), *Interactive Document Map* (IDMAP) e *Least Square Projection* (LSP). Adaptada de Bär et al.⁸

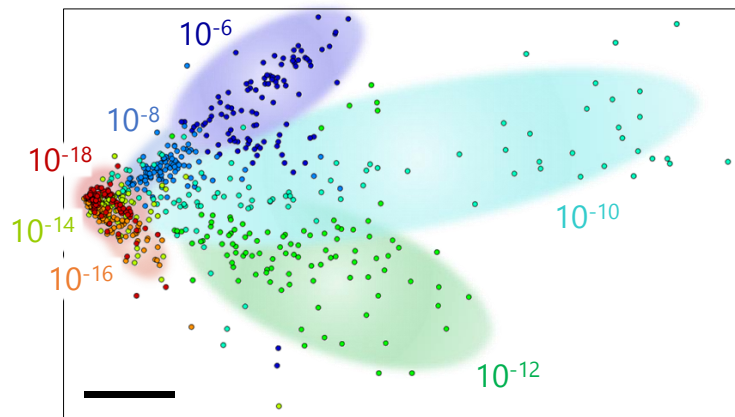


Figura 32. Gráfico IDMAP dos espectros Raman ($1100 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) para as diferentes concentrações de solução de R6G ($10^{-6} - 10^{-18} \text{ mol L}^{-1}$). Adaptada de Bär *et al.*⁸

Após a correção do efeito de dispersão, foi observado no gráfico de barras da Figura 31 (c) que o coeficiente de silhueta médio foi positivo para as quatro técnicas (0,83, 0,09, 0,77, 0,77), sendo a técnica de projeção CS a que apresentou maior coeficiente de silhueta (0,83). Conforme pode ser observado no mapa de visualização da Figura 33(a), uma forte discriminação entre as concentrações de R6G foi obtida com a técnica CS para substratos SERS com microcanais em forma de V. Portanto, essa mesma técnica de projeção foi utilizada para os substratos SERS sem microcanais e um coeficiente de silhueta de 0,78 foi obtido [Figura 33(b)].

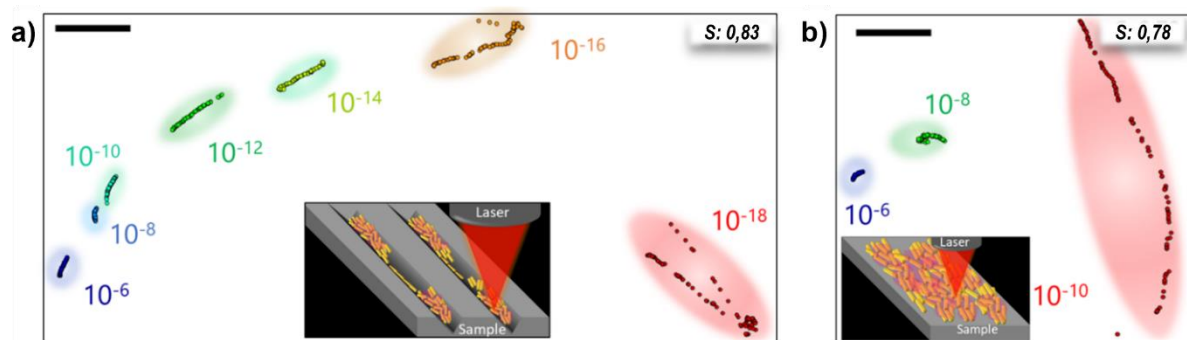


Figura 33. Classical Scaling Plots de espectros Raman ($1100 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) corrigidos da R6G em diferentes concentrações para (c) substratos SERS com e (d) sem microcanais em forma de V. A barra preta é apenas um guia para medir as distâncias entre os pontos dos dados. Todas as análises foram realizadas em diferentes substratos, usando um laser de 633 nm com tempo de exposição de 20 s e com 1 acc.

Nos dados corrigidos (Figura 33), o coeficiente de silhueta médio mostrou que houve maior discriminação entre as diferentes concentrações de solução de R6G para os substratos SERS com microcanais em forma de V em comparação com os substratos SERS sem microcanais. Além disso, os pontos de um mesmo grupo são

mais próximos entre si para os substratos com microcanais, indicando maior reprodutibilidade de intensidade dos espectros SERS nos substratos com microcanais comparado aos substratos sem microcanais, com exceção da concentração de 10^{-6} mol L⁻¹ em que o agrupamento de pontos foi parecido para ambos os substratos.

Os conjuntos de 100 espectros SERS nas maiores concentrações de solução de R6G apresentaram aglomerados de 100 pontos compactados para ambos os substratos. Com a diluição, esses pontos começam a se dispersar devido à razão ruído/resolução dos espectros. Para os substratos SERS com microcanais em forma de V esse fenômeno de dispersão ocorreu em concentrações menores que 10^{-16} mol L⁻¹, enquanto para substratos SERS sem microcanais, a dispersão já ocorreu na concentração de 10^{-10} mol L⁻¹ devido à menor sensibilidade desse sistema.

A sensibilidade do sistema pode ser comparada na Figura 34, onde as concentrações de 10^{-6} e 10^{-8} mol L⁻¹, para substratos SERS sem microcanais são equivalentes às respostas em concentrações de $\sim 10^{-10}$ e 10^{-11} mol L⁻¹ em substratos SERS com microcanais em forma de V.

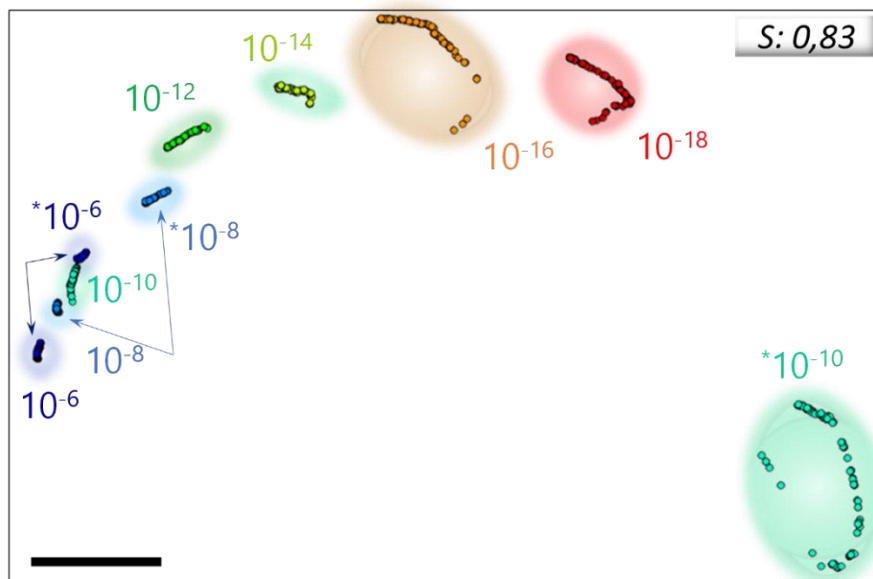


Figura 34. Comparação entre a sensibilidade dos substratos SERS com e sem microcanais do gráfico de *Classical Scalin* de espectros Raman ($1100 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) para diferentes concentrações ($10^{-6} - 10^{-18}$ mol L⁻¹) de R6G. Adaptada de Bär *et al.*⁸

A alta sensibilidade e excelente desempenho dos substratos SERS com microcanais em forma de V são dados pela combinação dos efeitos SIERS e SERS. A contribuição simultânea desses dois efeitos foi crucial para a detecção de uma única molécula.

5.6 Aplicação dos substratos SERS com microcanais na detecção de Tiram

O dissulfeto de tetrametiluram, comumente conhecido como Tiram, é um composto organossulfurado pertencente ao grupo dos ditiocarbamatos, que é usado como fungicida para prevenir doenças em sementes e plantações de frutas e vegetais.^{106,107} Também é usado na indústria da borracha como agente vulcanizante para dar rigidez à borracha natural.^{108,109} A exposição ao Tiram seja pelo ar ou por meio de alimentos contaminados pode colocar a saúde humana em risco.¹¹⁰ Em um trabalho recente,¹¹⁰ a citotoxicidade do Tiram foi estudada em condições *in vitro* usando glóbulos vermelhos humanos como modelo celular. Os autores mostraram que o Tiram induz a condição de estresse oxidativo nos glóbulos vermelhos e causa modificação oxidativa dos componentes celulares. Com isso, sérias consequências podem ocorrer nas funções do sangue e dos glóbulos vermelhos como: hipóxia, anemia, diminuição do poder antioxidante do sangue, coagulação dos glóbulos vermelhos, oclusão dos vasos sanguíneos e insuficiência renal.¹¹⁰

Dessa forma, a detecção de Tiram em baixas concentrações é de grande relevância, como por exemplo, para monitorar a quantidade de resíduos em alimentos.^{111,112} Dois trabalhos desenvolvidos no grupo de pesquisa do Laboratório de Materiais Funcionais (LMF) detectaram Tiram em baixas concentrações em seus respectivos substratos SERS. No primeiro, foram utilizados nanobastões de *core-shell* Au@Ag como substrato SERS²⁰, sendo que a menor concentração de solução de Tiram detectada foi de 10^{-7} mol L⁻¹. No segundo, foram utilizadas nanoesferas de Au depositadas em papel hidrofóbico por meio da impressão a jato de tinta como substrato SERS¹⁸, sendo que a menor concentração de solução de Tiram detectada nesse caso foi de 10^{-11} mol L⁻¹. No presente trabalho, o substrato SERS com microcanais em forma de V desenvolvido foi testado também para o fungicida Tiram. A estrutura molecular do Tiram está representada na Figura 35, juntamente com seus espectros Raman e SERS.

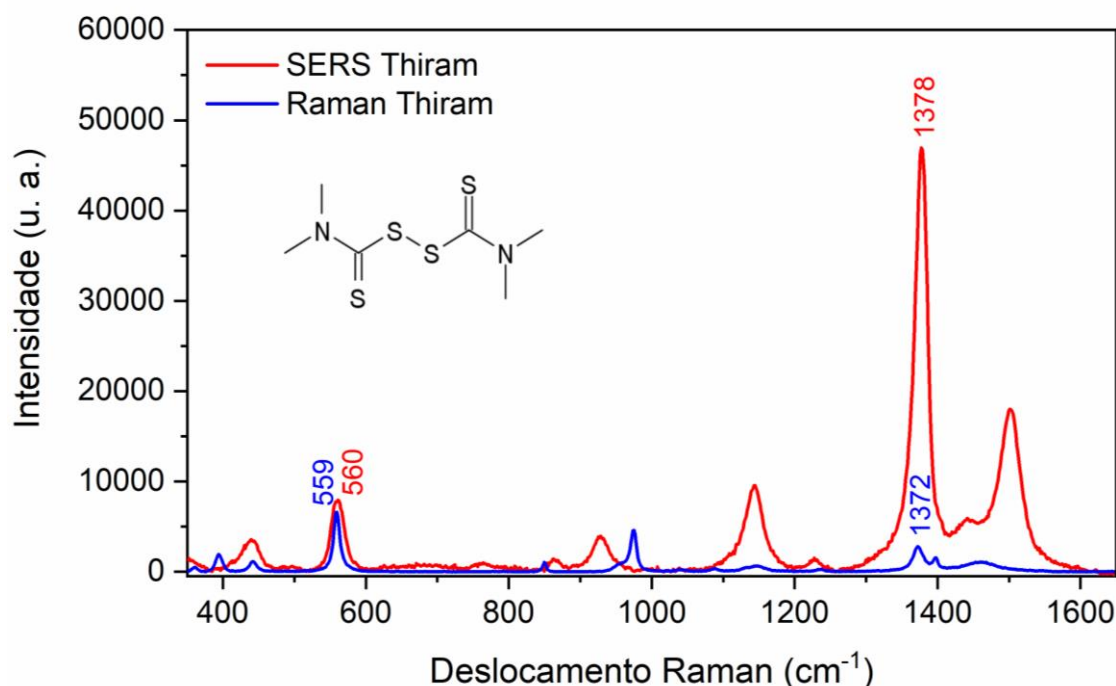


Figura 35. Comparação entre os espectros Raman (Tiram na forma de pó) e SERS (concentração: 10^{-10} mol L⁻¹) do Tiram usando *laser* com comprimento de onda de 633 nm com 10 s de exposição e 1 acc. O espectro SERS foi obtido dentro de um microcanal em forma de V, próximo à uma região de *coffee ring*, onde se encontram várias estruturas 3D de AuNRs.

Uma grande diferença entre as intensidades dos espectros Raman e SERS foi evidenciada. Além disso, enquanto no espectro Raman a banda que apresenta maior intensidade se encontra na região de 559 cm^{-1} , no SERS a banda mais intensa se encontra em 1378 cm^{-1} . Nota-se também que algumas bandas no SERS são observadas em regiões diferentes comparadas ao espectro Raman, o que pode ser atribuído à quimissorção da molécula de Tiram no substrato SERS.¹¹³ A molécula pode adsorver na superfície metálica de várias maneiras. A avaliação das intensidades relativas das bandas, comparando espectros Raman e SERS, pode fornecer informações sobre como a molécula está orientada em relação à superfície.¹¹⁴ De acordo com as regras de seleção de superfície para o SERS,¹¹⁵ os modos vibracionais que possuem contribuição do componente de tensor de polarizabilidade Raman perpendicular à superfície, são observados com maior intensidade no espectro SERS.

Essas mudanças observadas no espectro SERS em comparação com o espectro Raman mostram que há uma contribuição relevante do mecanismo químico de intensificação, apesar da maior contribuição na intensificação do SERS com o uso de NPs metálicas se dar por meio do mecanismo eletromagnético.¹¹⁶

As atribuições dos modos vibracionais do Tiram observadas nos espectros Raman e SERS estão apresentadas na Tabela 4. Na literatura científica são encontradas diferentes atribuições para o Tiram.¹¹⁷⁻¹¹⁹ No presente trabalho, essas atribuições foram realizadas tomando-se como base a tentativa de atribuição relatada no trabalho de Ivanov *et. al.*¹²⁰ Os autores realizaram uma atribuição completa das bandas dos espectros Raman e SERS do Tiram por meio de simulações computacionais baseadas na teoria do funcional de densidade (DFT, da sigla em inglês para *Density Functional Theory*). Para as simulações, foi considerada a molécula de Tiram isolada, a molécula fragmentada ligada à um único átomo de Ag e ligada a um *cluster* de 20 átomos de Ag. Eles compararam os espectros Raman e SERS simulados do Tiram com os espectros Raman e SERS experimentais, sendo que para os espectros SERS experimentais foram utilizados nanofios de Ag. Embora eles tenham usado Ag em vez de Au, a maioria dos deslocamentos Raman dos máximos das bandas dos espectros SERS experimentais do Tiram adsorvido em nanofios de Ag puderam ser comparados com os deslocamentos Raman dos máximos das bandas dos espectros SERS do Tiram observadas no presente trabalho empregando AuNRs como superfície intensificadora.

Tabela 4. Atribuição de bandas do Tiram observadas nos espectros Raman e SERS.¹²⁰

Espectro Raman (cm⁻¹)	Espectro SERS (cm⁻¹)	Atribuições^a
360		$\delta(\text{S}=\text{C}-\text{S})$
394		$\nu(\text{C}-\text{S}) + \delta(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3)$
	440	$\nu_{\text{as}}(\text{S}-\text{C}-\text{S}) + \delta(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3)$
442		$\delta(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3)$
559		$\delta(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3) + \nu(\text{S}-\text{S})$
	560	$\nu_{\text{s}}(\text{S}-\text{C}-\text{S}) + \delta(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3)$
850		$\nu(\text{C}-\text{S}) + \nu(\text{CH}_3-\text{N})$
	863	$\nu_{\text{s}}(\text{S}-\text{C}-\text{S}) + \nu_{\text{s}}(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3)$
	928	$\nu_{\text{as}}(\text{S}-\text{C}-\text{S}) + \nu_{\text{as}}(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3)$
975		$\nu_{\text{as}}(\text{S}=\text{C}-\text{S}) + \nu(\text{CH}_3-\text{N})$
1040		$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3) + \delta(\text{CH}_3)$
1088		$\delta(\text{CH}_3)$
1144		$\nu_{\text{as}}(\text{S}=\text{C}-\text{N}) + \delta(\text{CH}_3)$
	1144	$\delta(\text{CH}_3) + \nu(\text{C}=\text{N})$
	1228	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3) + \delta(\text{CH}_3)$
1236		$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3) + \delta(\text{CH}_3)$
1372		$\delta(\text{CH}_3) + \nu(\text{C}-\text{N})$
	1378	$\delta(\text{CH}_3), \nu(\text{C}=\text{N}) + \nu_{\text{s}}(\text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_3)$
1397		$\delta(\text{CH}_3)$
	1441	$\delta(\text{CH}_3)$
1460		$\nu(\text{C}-\text{N}) + \delta(\text{CH}_3)$
	1502	$\nu(\text{C}=\text{N}) + \delta(\text{CH}_3)$

ν_{s} = estiramento simétrico; ν_{as} = estiramento antissimétrico; δ = deformação angular

A mudança nos deslocamentos Raman dos máximos das bandas e nas intensidades relativas são um indício da interação química entre o Tiram e os AuNRs. Essa interação promove a quebra da ligação S–S da molécula de Tiram e sua adsorção na superfície metálica por meio da ligação Au–S, dando origem a dois grupos dimetilditiocarbamatos^{116,121,122}. Dessa forma, se esperaria o desaparecimento da banda mais intensa do espectro Raman do Tiram (559 cm^{-1}), referente ao modo de estiramento S–S, mas uma banda em 560 cm^{-1} com intensidade relativa muito menor pode ser observada no espectro SERS. Embora as bandas estejam em posições semelhantes, suas atribuições são distintas. Ivanov *et al.*¹²⁰ mostraram através das simulações por DFT que essa banda é atribuída ao modo de estiramento simétrico S–C–S, evidenciando a importância da simulação para a interpretação dos dados.

A banda em 1372 cm^{-1} no espectro Raman do Tiram refere-se à combinação entre os modos de estiramento C–N e de deformação angular CH_3 . Uma mudança de 6 cm^{-1} para maiores valores de deslocamento Raman foi observada no máximo dessa banda no espectro SERS, o que pode significar um aumento do caráter de dupla ligação na ligação carbono-nitrogênio da porção ditiocarbamato do fragmento.

A adsorção do Tiram ocorre de maneira perpendicular à superfície dos AuNRs, o que resulta em elevadas intensificações dos modos vibracionais que estão no plano de simetria do fragmento de Tiram, como é o caso do estiramento C=N correspondente à banda mais intensa do espectro SERS na região de 1378 cm^{-1} .

A Figura 36, adaptada de Sánchez-Cortés *et al.*, ilustra duas possibilidades de interação química do fragmento de Tiram (dimetilditiocarbamato) com uma superfície metálica: quimissorção bidentada ou monodentada.

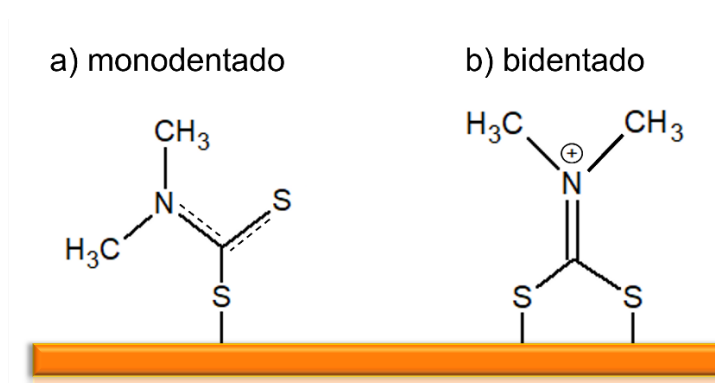


Figura 36. Formas de adsorção do Tiram em uma superfície de Au. Adaptada de Sánchez-Cortés *et al.*¹²¹

De acordo com Li *et al.*,¹¹⁶ considerando um substrato SERS com AuNPs, as duas formas de interação podem existir dependendo da concentração do Tiram. Os autores verificaram que na concentração de 10^{-5} mol L⁻¹ de Tiram, predominam as estruturas monodentadas do dimetilditiocarbamato, enquanto para a concentração de 10^{-6} mol L⁻¹, as duas formas de interação existem simultaneamente. Isso provavelmente se deve à maior área superficial disponível nas AuNPs em menores concentrações de Tiram (10^{-6} mol L⁻¹), o que também permite a interação da molécula com a superfície na forma bidentada.

Os substratos SERS com microcanais em forma de V foram utilizados para a detecção de Tiram, em soluções de diferentes concentrações, por meio da aquisição de centenas de espectros Raman (vários mapeamentos de 50 pontos). As Figuras 37 (a-f) mostram mapeamentos SERS do Tiram em regiões de borda dos microcanais (a, b), regiões dentro dos microcanais (c, d) e regiões sem microcanais (e, f) para a concentração de solução de 10^{-7} mol L⁻¹ de Tiram.

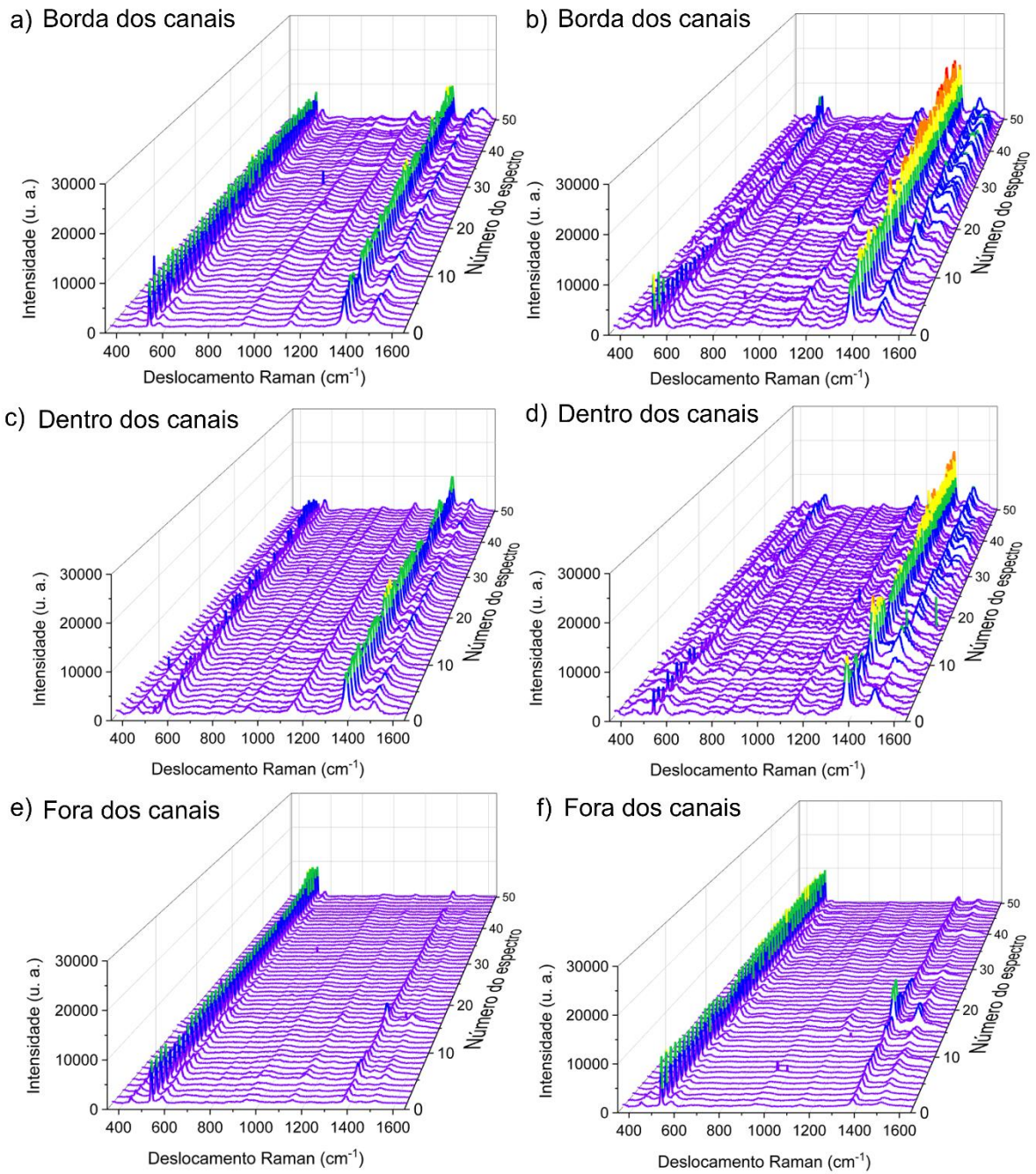


Figura 37. Conjuntos de 100 espectros SERS do Tiram na concentração 10^{-7} mol L⁻¹ em regiões de borda dos microcanais (a, b), dentro dos microcanais (c, d) e fora dos microcanais (e, f).

Os dados de mapeamentos na borda e dentro dos microcanais em forma de V apresentam maior intensidade do espectro SERS do Tiram quando comparado aos mapeamentos em regiões sem microcanais. Esse resultado corrobora com o que já foi abordado para a molécula de R6G [seção 5.2, página 61], onde foi demonstrado que os microcanais apresentam uma intensificação do espectro Raman da R6G mesmo quando os AuNRs não estão presentes no substrato, evidenciando o SIERS. Além disso, comparando os dados da borda dos microcanais com os dados obtidos dentro dos microcanais, não foi observada uma diferença significativa. Como relatado anteriormente para a banda LO do Si, a intensidade na borda dos microcanais era maior comparada às regiões dentro dos microcanais. Aqui é importante destacar que para sondar essas diferenças, na presença de AuNRs, a deposição dos mesmos deve acontecer de forma bastante uniforme, para que as configurações de AuNRs sejam semelhantes na borda e dentro dos microcanais em forma de V. Nesse trabalho, no fundo dos microcanais predominam estruturas 3D de AuNRs enquanto nas paredes e na região de borda do microcanal, predominam pequenos aglomerados de AuNRs, conforme mostrado na imagem de SEM da Figura 27 (a) na seção 5.4, página 69. Isso justifica o motivo da intensidade do espectro SERS do Tiram ser maior dentro do microcanal comparado à região de borda.

Complementando os mapeamentos das Figuras 37 (e, f), a Figura 38 mostra mais um conjunto de espectros de 50 pontos para o Tiram em uma região sem microcanais em forma de V, nesse caso abrangendo uma região próxima à borda da gota, evidenciando o efeito de *coffee ring* em alguns pontos do mapeamento.

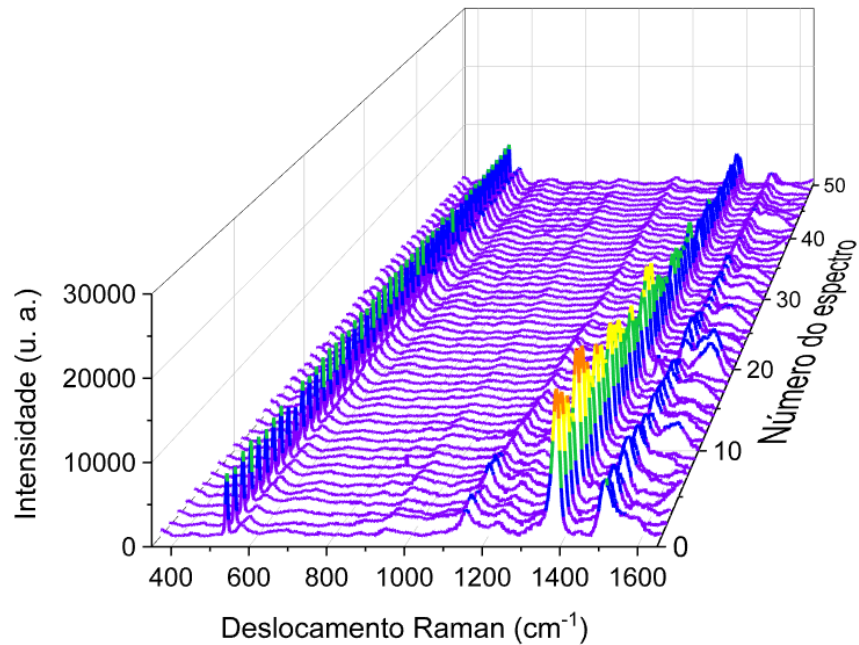


Figura 38. Conjunto de 50 espectros SERS do Tiram na concentração 10^{-7} mol L $^{-1}$ em uma região sem microcanal próximo à borda da gota de AuNRs (*coffee ring*).

Como observado nos espectros da Figura 38, a intensidade em alguns pontos próximos ao *coffee ring*, na região sem microcanais é similar à intensidade nas regiões de borda e dentro dos microcanais. Porém, essa maior intensidade se repete com mais frequência nos mapeamentos realizados nas regiões dentro e na borda dos microcanais em forma de V. Na maioria dos espectros na região sem microcanais [Figura 37(e-f)], as bandas são pouco intensas comparadas às bandas dos espectros dentro e na borda dos microcanais. Para melhor visualizar esse conjunto de resultados nas regiões de borda, dentro e fora dos microcanais, foi realizada a projeção dos dados multivariados conforme apresenta a Figura 39, para a concentração de 10^{-7} mol L $^{-1}$.

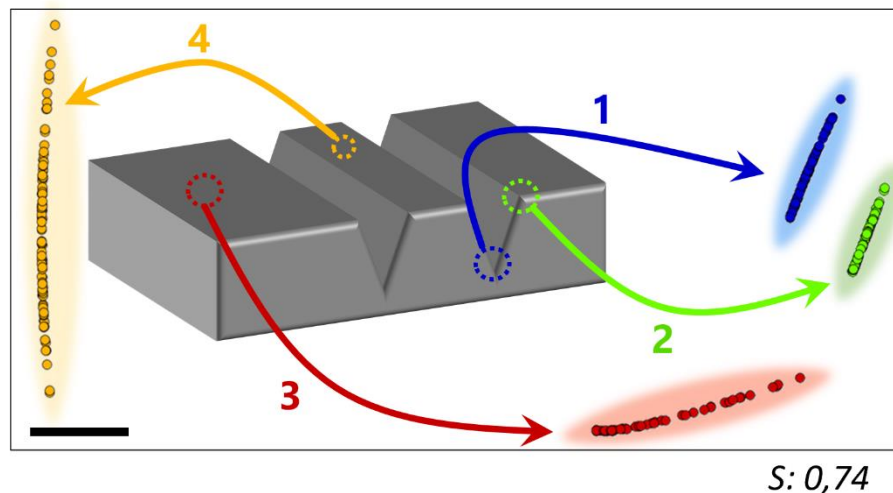


Figura 39. *Classical scaling* [(coeficiente de silhueta: 0.74)]. Mapa 2D referente aos espectros em diferentes regiões do substrato SERS na concentração de 10^{-7} mol L $^{-1}$ de Tiram. Elaborada por Flávio Makoto Shimizu.

Cada ponto de um conjunto da Figura 39 representa um espectro SERS. A projeção multivariada mostrou que os conjuntos 1, 2 e 3 estão mais agrupados e próximos entre si. Os conjuntos 1 e 2 referem-se, respectivamente, às regiões de dentro e da borda dos microcanais em forma de V, enquanto o conjunto 3 corresponde à região fora dos microcanais, próxima ao *coffee ring*. Apesar da semelhança, esse último conjunto (3) se mostrou mais disperso quando comparado aos conjuntos de espectros SERS nas regiões de borda (2) e dentro (1) dos microcanais. O conjunto 4, referente à região sem microcanal distante do *coffee ring*, é o que mais se diferencia dos demais, por apresentar baixa intensidade nos espectros SERS. Em comparação com os dados para a R6G, novamente se notou uma grande diferença entre os espectros SERS nas regiões com e sem microcanais em forma de V. Porém, nesse caso, a menor concentração detectada na região sem microcanal foi de 10^{-7} mol L $^{-1}$.

Sabendo que as melhores respostas SERS ocorreram nas regiões dos microcanais, a partir desse momento serão abordados apenas os conjuntos de espectros SERS obtidos nas regiões de borda e dentro dos microcanais, conforme mostra a Figura 40, para as concentrações de 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} mol L $^{-1}$ de Tiram.

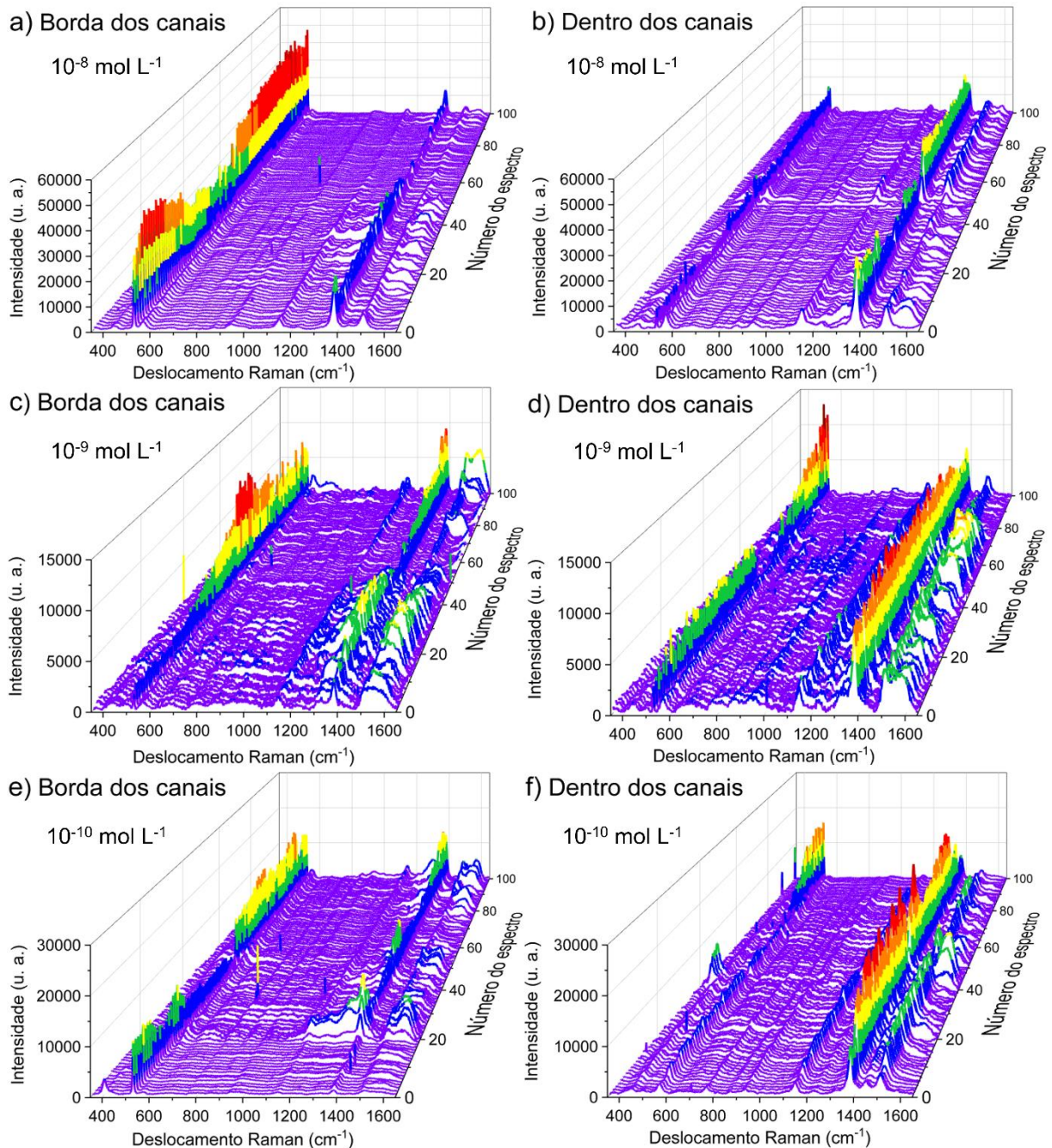


Figura 40. Conjuntos de 100 espectros SERS do Tiram nas concentrações de solução de 10^{-8} mol L⁻¹ (a, b) 10^{-9} mol L⁻¹ (c, d) e 10^{-10} mol L⁻¹ (e, f) em regiões de borda dos microcanais (a, c, e) e dentro dos microcanais (b, d, f).

Foi observado na Figura 40 que para todas as concentrações de solução de Tiram utilizadas, os espectros SERS são mais evidentes nas regiões dentro dos microcanais em forma de V quando comparados aos espectros das regiões de borda dos microcanais. Além disso, foi observado que os espectros referentes à menor concentração detectada (10^{-10} mol L⁻¹) apresentaram maiores valores de intensidade quando comparado aos espectros referentes à concentração de 10^{-8} mol L⁻¹. Isso ocorreu pois, para o substrato SERS na concentração de 10^{-10} mol L⁻¹ de Tiram, foram

encontradas, por meio do microscópio acoplado ao espectrômetro Raman, regiões em que a borda da gota (*coffee ring*) da suspensão de AuNRs estava contida dentro de um microcanal em forma de V. Próximo a essa região se observam os espectros SERS da Figura 40 (f). Porém, exatamente na região de *coffee ring*, saturada de estruturas 3D de AuNRs dentro dos microcanais, a intensidade é tão elevada (como a que foi observada no espectro pontual mostrado na Figura 35) que a maioria dos espectros do mapeamento realizado nessa região ultrapassam a capacidade de detecção do equipamento. Isso dificultou a análise de dados por mapeamentos em regiões de *coffee ring* dentro dos microcanais nas mesmas condições de tempo de exposição e acumulação utilizadas em todos os mapeamentos. Para esse substrato SERS não foram realizadas imagens de SEM. Contudo, a Figura 26 (e, f) da seção 5.4, página 68, mostra uma imagem de SEM representativa de regiões com saturação de estruturas 3D de AuNRs nas extremidades dos microcanais com relação aos seus comprimentos, que pode estar associado com uma região próxima ao *coffee ring*.

Esses dados para a molécula de Tiram também mostraram que a associação do efeito SERS com o SIERS é essencial para melhorar a performance do substrato e alcançar a detecção em baixas concentrações.

A média e desvio padrão para os conjuntos de espectros SERS nas concentrações de 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} mol L⁻¹ de Tiram nas regiões de borda e dentro dos microcanais em forma de V estão apresentados na Figura 41 (a, b). Para melhor visualizar esses conjuntos de espectros a projeção multivariada foi realizada (Figura 41 c, d).

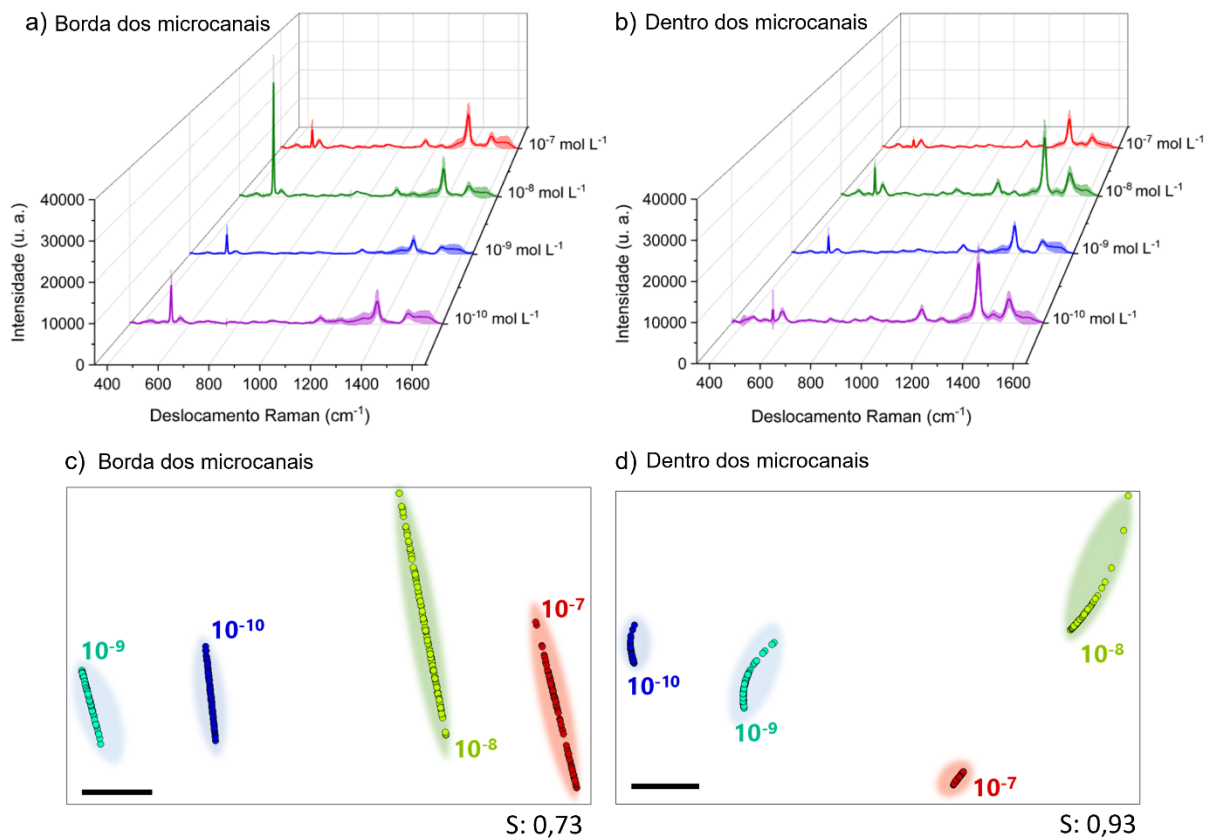


Figura 41. Média e desvio padrão para os conjuntos de 100 espectros SERS nas concentrações de solução de Tiram de 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} mol L⁻¹ nas regiões de borda dos microcanais em forma de V (a) e nas regiões dentro dos microcanais em forma de V (b). *Classical Scaling*: Coeficiente de silhueta 0,73 para as regiões de borda dos microcanais (c) e 0,93 para as regiões dentro dos microcanais em forma de V (d). Figuras c) e d) elaboradas por Flávio Makoto Shimizu.

Foi observado, para todas as concentrações, que nas regiões de borda dos microcanais em forma de V a banda LO do Si (521 cm^{-1}) apresenta maiores valores de intensidade quando comparada à banda mais intensa do Tiram (1378 cm^{-1}). Já na região dentro dos microcanais ocorre o oposto, evidenciando que o espectro SERS do Tiram dentro dos microcanais apresenta-se mais pronunciado. Essa maior resposta SERS se deve à formação de estruturas 3D de AuNRs, que ocorre predominantemente nas regiões dentro dos microcanais em forma de V.

Como esperado, a banda LO foi mais intensa nas regiões de borda dos microcanais, onde o SIERS se apresenta de forma mais pronunciada, e o SERS é menos intenso em relação às regiões de dentro dos microcanais devido à menor quantidade de AuNRs nas bordas, associada à probabilidade de geração de *hot spots*. Dentro dos microcanais, a contribuição do SERS é bastante evidente por conta da grande quantidade de estruturas 3D de AuNRs. Dessa forma, quando o espectro SERS é muito intenso, a banda LO do Si se apresenta com intensidade muito baixa.

Isso não significa que o SIERS não se manifeste dentro dos microcanais, mas que nesse caso, sua contribuição na intensidade do espectro é pouco significativa devido à grande quantidade de estruturas 3D de AuNRs dentro dos microcanais.

Adicionalmente, com o uso da técnica de projeção multidimensional *Classical Scaling*, a visualização de informações foi facilitada, e como mostrado na Figura 41 (c, d), os espectros nas bordas dos microcanais apresentaram maior dispersão dos dados e coeficiente de silhueta igual a 0,73. Já para os espectros coletados dentro dos microcanais, foi observado um melhor agrupamento dos espectros para cada concentração de Tiram, motivo da obtenção de um maior valor de coeficiente de silhueta, 0,93. Portanto, pode-se dizer que medidas feitas dentro dos microcanais possibilitam melhor discriminação de diferentes concentrações de analitos e uma maior reprodutibilidade de intensidade dos espectros SERS.

Para melhor avaliação sobre os dados, a Figura 42 mostra os agrupamentos de todas as concentrações tanto na borda quanto dentro dos microcanais, além das regiões sem microcanais para a concentração de 10^{-7} mol L $^{-1}$, em um mesmo mapa 2D.

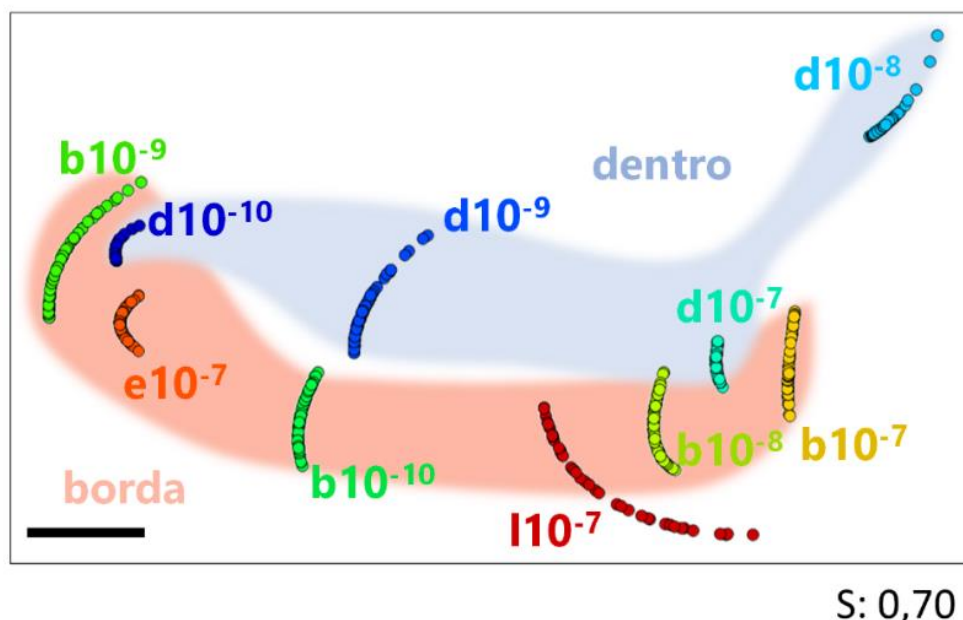


Figura 42. *Classical Scaling*: Coeficiente de silhueta 0,70. Com discriminação entre os dados referentes às regiões de borda (b, sombra vermelha) e dentro (d, sombra azul) dos microcanais em forma de V. Inclui os agrupamentos referentes às regiões fora dos microcanais (e, correspondente à uma região entre canais) e [l, correspondente à uma região longe dos microcanais, próximo a borda da gota (*coffee ring*) de AuNRs]. Elaborada por Flávio Makoto Shimizu

Nesse mapa 2D, foi observado que os dados dentro dos microcanais, correspondente à região com sombra na cor azul, e na borda, correspondente à região com sombra na cor vermelha, foram discriminados. Além disso, os grupos $e10^{-7}$ e $l10^{-7}$, correspondentes à região sem microcanais, estão juntamente com os dados referentes à região de borda dos microcanais, o que sugere que a superfície do substrato possui uma interação diferente com o analito comparado às regiões do substrato dentro dos microcanais em forma de V.

Outra observação relevante foi a sensibilidade do sistema para o Tiram. O agrupamento $e10^{-7}$, que corresponde à região sem microcanais, fora da região de *coffee ring*, está próximo dos agrupamentos $d10^{-10}$ e $b10^{-9}$ que correspondem, respectivamente, às regiões de dentro e da borda dos microcanais em forma de V.

Até o momento, a menor concentração detectada nesse trabalho foi de 10^{-10} mol L⁻¹. Devido à intensidade dos espectros SERS dentro e na borda dos microcanais em forma de V ainda ser elevada para essa concentração, é possível que concentrações de Tiram ainda menores sejam detectadas. Porém, considerando que o limite de detecção foi de 10^{-10} mol L⁻¹, a Tabela 5 mostra uma comparação desse limite com alguns limites de detecção relatados na literatura científica para o Tiram.

Tabela 5. Comparação entre o limite de detecção obtido nesse trabalho com os limites de detecção encontrados na literatura para o Tiram.

Substrato SERS	Limite de detecção (mol L⁻¹)
Estruturas 3 D de AuNRs dentro de microcanais em forma de V (esse trabalho)	1×10^{-10}
Carbeto de titânio MXene/ AuNRs ¹²³	1×10^{-8}
Matriz de <i>hotspot</i> 3D de AuNPs em um filme de ilha de Au (AuIF) com uma camada espaçadora de 1,4-benzenodimetanotiol (BDMT), AuNPs@BDMT@AuIF ¹²⁴	$1,3 \times 10^{-8}$
AuNRs ¹²⁵	$1,1 \times 10^{-8}$
Nanoestrutura de Au-Ag multiramificada via agregação de nanoestrelas ¹²⁶	$6,3 \times 10^{-7}$
Nanobastões de <i>core-shell</i> Au@Ag ²⁰	1×10^{-7}
Substrato hierárquico de AuNRs e nanofios de Ag ¹²⁷	1×10^{-10}
Nanopartículas de Au@Ag em forma de flor ¹²⁸	1×10^{-11}
Substrato baseado em impressão a jato de tinta (nanoesfera de Au em papel hidrofóbico) ¹⁸	1×10^{-11}
Nanofios de Ag ¹²⁹	1×10^{-12}
Nanocubos de Ag ¹²⁹	1×10^{-15}
Nanoestrelas de Ag multiramificadas ¹¹³	$1,78 \times 10^{-18}$
Nanodendritos de Ag ¹³⁰	$2,6 \times 10^{-19}$

Percebeu-se que o substrato SERS desenvolvido nesse trabalho apresentou detecções em menores concentrações comparadas aos outros trabalhos que envolvem o uso de AuNRs. Para os dois últimos trabalhos listados na Tabela 5 (nanoestrelas de Ag multiramificadas e nanodendritos de Ag), que envolvem apenas o uso de nanoestruturas de Ag com muitas pontas, notou-se que a detecção de Tiram aconteceu em concentrações no nível attomolar. Provavelmente, isso ocorre pela razão de nanoestruturas com muitas pontas favorecerem a formação de muitos *hot spots*, aumentando a capacidade de detecção do substrato SERS.^{131,132} Além disso, a intensidade de um espectro SERS geralmente é maior quando são empregadas nanopartículas de Ag em vez de Au.¹³³ Porém, controlar o tamanho e a forma na síntese de AgNPs geralmente é mais difícil devido à maior reatividade destas quando comparadas com AuNPs.¹³⁴

6. Conclusões

Os microcanais em forma de V foram obtidos como esperado pelo planejamento proposto, de forma que sua largura no fundo dos microcanais (15 nm) fosse semelhante à largura dos AuNRs sintetizados (19 nm). O alinhamento ponta a ponta de AuNRs foi obtido em várias regiões próximas ao centro dos substratos SERS com microcanais em forma de V. Estruturas 3D foram obtidas em regiões próximas à extremidade dos microcanais e as análises foram priorizadas nestas regiões devido à maior resposta SERS. Dados de simulação por elementos finitos para o campo elétrico espalhado confirmaram que o efeito SIERS fornece padrões de interferências construtivas gerados pelo desenho geométrico em forma de V, ocorrendo tanto nos microcanais quanto em suas vizinhanças. O substrato com microcanais em forma de V na ausência de AuNRs exibiu um aumento na intensidade do espectro Raman do modo LO do Si de cerca de 2 vezes maior em relação ao substrato sem microcanais em forma de V, e 4 vezes maior no caso da molécula de R6G. A contribuição simultânea dos efeitos SIERS e SERS no substrato de Si com microcanais em forma de V na presença de AuNRs foram cruciais para melhorar os substratos SERS e alcançar a detecção attomolar da R6G. A projeção multivariada dos espectros SERS evidencia a alta sensibilidade e reprodutibilidade de intensidade com um coeficiente de silhueta de 0,83 alcançado pelo substrato SERS com microcanais em forma de V. As concentrações de 10^{-6} - 10^{-8} mol L⁻¹ para os substratos SERS sem microcanais são aproximadamente equivalentes às respostas observadas em 10^{-10} - 10^{-11} mol L⁻¹ nos substratos SERS com microcanais em forma de V.

Nos espectros SERS do Tiram, a observação de novas bandas, a não observação de outras e a variação na intensidade de algumas bandas fornecem evidências do mecanismo químico de intensificação. Além disso, a partir da posição das bandas do espectro SERS do Tiram, foi proposto que a adsorção química dos grupos dimetilditiocarbamatos ocorrem tanto na forma monodentada quanto bidentada. Foi demonstrado que as regiões que correspondem ao microcanal em forma de V apresentam maior sensibilidade para o Tiram comparada às regiões sem microcanais devido à contribuição simultânea dos efeitos SERS e SIERS. Por fim, a projeção multivariada mostrou que as regiões dentro dos microcanais (coeficiente de silhueta 0,93) se mostraram mais efetivas para detecção por SERS em relação às

regiões da borda dos microcanais (coeficiente de silhueta 0,73) devido provavelmente à presença de estruturas 3D de AuNRs dentro dos microcanais em regiões próximas às suas extremidades.

Foi demonstrado que os substratos de Si com microcanais em forma de V, nos quais se manifestam o SIERS, podem ser empregados juntamente com AuNRs para gerar *hot spots* distribuídos ao longo dos microcanais, em regiões próximas às suas extremidades, e fornecer substratos SERS com reprodutibilidade de intensidade e altamente sensíveis para detecções de moléculas em concentrações muito baixas, tais como a detecção de uma única molécula.

7. Perspectivas

Dentre os desdobramentos desse trabalho pode-se citar: a utilização de outras moléculas de interesse ambiental; a realização de sínteses de nanoestruturas de Au com outros formatos, priorizando aqueles em que muitas pontas são formadas como nanoestrelas e nanodendritos de Au; e a deposição dessas nanoestruturas nos microcanais em forma de V obtidos nesse trabalho para melhorar ainda mais a capacidade de detecção em concentrações muito baixas do substrato SERS desenvolvido.

Outro desdobramento pode ser a otimização do efeito SIERS observado em microcanais em forma de V na ausência de AuNRs, por meio da variação de tamanhos dos microcanais e dos comprimentos de onda da radiação incidente. Além disso, o ângulo de incidência da radiação pode ser alterado para investigar outros efeitos.

Referências

1. Das, R. S. & Agrawal, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vib. Spectrosc.* **57**, 163–176 (2011).
2. Hu, J. & Zhang, C. Y. Sensitive detection of nucleic acids with rolling circle amplification and surface-enhanced raman scattering spectroscopy. *Anal. Chem.* **82**, 8991–8997 (2010).
3. Guerrini, L., Garcia-Rico, E., O’loghlen, A., Giannini, V. & Alvarez-Puebla, R. A. Surface-enhanced raman scattering (Sers) spectroscopy for sensing and characterization of exosomes in cancer diagnosis. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–28 (2021).
4. Tang, H., Zhu, C., Meng, G. & Wu, N. Review—Surface-Enhanced Raman Scattering Sensors for Food Safety and Environmental Monitoring. *J. Electrochem. Soc.* **165**, B3098–B3118 (2018).
5. Jiang, J. *et al.* Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of Pesticide Residues Using Transparent Adhesive Tapes and Coated Silver Nanorods. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 9129–9135 (2018).
6. Raveendran, J. & Docoslis, A. Detection and quantification of toxicants in food and water using Ag–Au core-shell fractal SERS nanostructures and multivariate analysis. *Talanta* **231**, (2021).
7. Lu, Y. *et al.* A silver@gold nanoparticle tetrahedron biosensor for multiple pesticides detection based on surface-enhanced Raman scattering. *Talanta* **234**, (2021).
8. Bär, J. *et al.* Silicon Microchannel-Driven Raman Scattering Enhancement to Improve Gold Nanorod Functions as a SERS Substrate toward Single-Molecule Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **13**, 36482–36491 (2021).
9. Raman, C. V. & Krishnan, K. S. A new type of secondary radiation. *Nature* **121**, 501–502 (1928).
10. Tobias, R. S. Raman Spectroscopy in Inorganic Chemistry I. Theory. *J. Chem.*

- Educ.* **44**, 2–8 (1967).
11. Sala, O. *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*. (2a ed. São Paulo: UNESP, 1995).
 12. Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. (6a ed. Porto Alegre: Bookman, 2009).
 13. Hollas, J. M. *Basic Atomic and Molecular Spectroscopy*. (Royal Society of Chemistry, 2002).
 14. Faria, D. L. A. de, Santos, L. G. C. & Gonçalves, N. S. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman. *Quim. Nova* **20**, 319–323 (1997).
 15. Nasdala, L., Smith, D. C., Kaindl, R. & Ziemann, M. a. Raman spectroscopy: analytical perspectives in mineralogical research. in *EMU Notes in Mineralogy* vol. 6 1–63 (2004).
 16. Beattie, I. R. Vibrational infrared and Raman spectroscopy in inorganic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **4**, 107–153 (1975).
 17. Wang, Y., Yan, B. & Chen, L. SERS Tags: Novel optical nanoprobe for bioanalysis. *Chem. Rev.* **113**, 1391–1428 (2013).
 18. Godoy, N. V. *et al.* Ultrasensitive inkjet-printed based SERS sensor combining a high-performance gold nanosphere ink and hydrophobic paper. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **320**, No. 128412 (2020).
 19. Alvarez-Puebla, R. A. & Liz-Marzán, L. M. SERS-based diagnosis and biodetection. *Small* **6**, 604–610 (2010).
 20. Pastorello, M., Sigoli, F. A., dos Santos, D. P. & Mazali, I. O. On the use of Au@Ag core-shell nanorods for SERS detection of Thiram diluted solutions. *Spectrochim. Acta A* **231**, No. 118113 (2020).
 21. Zong, C. *et al.* Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges. *Chem. Rev.* **118**, 4946–4980 (2018).
 22. Lane, L. A., Qian, X. & Nie, S. SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-

- Free Detection to Spectroscopic Tagging. *Chem. Rev.* **115**, 10489–10529 (2015).
23. Alves, R. S., Sigoli, F. A. & Mazali, I. O. Aptasensor based on a flower-shaped silver magnetic nanocomposite enables the sensitive and label-free detection of troponin I (cTnI) by SERS. *Nanotechnology* **31**, No. 505505 (2020).
 24. Sun, Y. *et al.* Facile fabrication of three-dimensional gold nanodendrites decorated by silver nanoparticles as hybrid SERS-active substrate for the detection of food contaminants. *Food Control* **122**, No. 107772 (2021).
 25. Yang, S., Dai, X., Stogin, B. B. & Wong, T. S. Ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering detection in common fluids. *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 268–273 (2016).
 26. Fleischmann, M., Hendra, P. J. & McQuillan, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163–166 (1974).
 27. Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects.* (Elsevier, 2009).
 28. Jeanmaire, D. L. & Van Duyne, R. P. Surface Raman spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* **84**, 1–20 (1977).
 29. Albrecht, M. G. & Creighton, J. A. Anomalously Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5215–5217 (1977).
 30. Haynes, C. L., Yonzon, C. R., Zhang, X. & Van Duyne, R. P. Surface-enhanced Raman sensors: Early history and the development of sensors for quantitative biowarfare agent and glucose detection. *J. Raman Spectrosc.* **36**, 471–484 (2005).
 31. Moskovits, M. Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. *J. Chem. Phys.* **69**, 4159–4161 (1978).
 32. Van Duyne, R. P. Laser Excitation of Raman Scattering from Adsorbed Molecules on Electrode Surfaces. in *C. B. Moore (Ed.), Chemical and Biochemical Applications of Lasers* 101–184 (Academic Press., 1979).

33. Campion, A., Kambhampati, P., Campion, A. & Harris, C. Surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **27**, 241–250 (1998).
34. Schlücker, S. Surface-enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 4756–4795 (2014).
35. Moskovits, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: A brief retrospective. *J. Raman Spectrosc.* **36**, 485–496 (2005).
36. Valley, N., Greeneltch, N., Van Duyne, R. P. & Schatz, G. C. A look at the origin and magnitude of the chemical contribution to the enhancement mechanism of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): Theory and experiment. *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 2599–2604 (2013).
37. Lombardi, J. R. & Birke, R. L. Excitation profiles and the continuum in SERS: Identification of Fano line shapes. *J. Phys. Chem. C* **114**, 7812–7815 (2010).
38. Lombardi, J. R. & Birke, R. L. Theory of surface-enhanced raman scattering in semiconductors. *J. Phys. Chem. C* **118**, 11120–11130 (2014).
39. Kasani, S., Curtin, K. & Wu, N. A review of 2D and 3D plasmonic nanostructure array patterns: Fabrication, light management and sensing applications. *Nanophotonics* **8**, 2065–2089 (2019).
40. Willets, K. A. & Van Duyne, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 267–297 (2007).
41. Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. Quantifying SERS enhancements. *MRS Bull.* **38**, 631–640 (2013).
42. Kleinman, S. L., Frontiera, R. R., Henry, A. I., Dieringer, J. A. & Van Duyne, R. P. Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 21–36 (2013).
43. Godoy, N. V. Production of paper-based SERS substrates by inkjet-printing method. (Unicamp - Universidade Estadual de Campinas, 2020).
44. Shvalya, V., Filipič, G., Zavašnik, J., Abdulhalim, I. & Cvelbar, U. Surface-enhanced Raman spectroscopy for chemical and biological sensing using

- nanoplasmonics: The relevance of interparticle spacing and surface morphology. *Appl. Phys. Rev.* **7**, No. 031307 (2020).
45. Srivastava, S. K., Li, A., Li, S. & Abdulhalim, I. Optimal interparticle gap for ultrahigh field enhancement by LSP excitation via ESPs and confirmation using SERS. *J. Phys. Chem. C* **120**, 28735–28742 (2016).
 46. Zhang, Y. J. *et al.* Probing the Location of 3D Hot Spots in Gold Nanoparticle Films Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **91**, 5316–5322 (2019).
 47. Halas, N. J., Lal, S., Chang, W. S., Link, S. & Nordlander, P. Plasmons in strongly coupled metallic nanostructures. *Chem. Rev.* **111**, 3913–3961 (2011).
 48. Chapus, L. *et al.* Tunable SERS Platforms from Small Nanoparticle 3D Superlattices: A Comparison between Gold, Silver, and Copper. *ChemPhysChem* **18**, 3066–3075 (2017).
 49. Khoury, C. G. & Vo-Dinh, T. Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization. *J. Phys. Chem. C* **112**, 18849–18859 (2008).
 50. Cortijo-Campos, S. *et al.* Raman amplification in the ultra-small limit of Ag nanoparticles on SiO₂ and graphene: Size and inter-particle distance effects. *Mater. Des.* **192**, 0–10 (2020).
 51. Noguez, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: The influence of shape and physical environment. *J. Phys. Chem. C* **111**, 3606–3619 (2007).
 52. Jain, P. K., Eustis, S. & El-Sayed, M. A. Plasmon coupling in nanorod assemblies: Optical absorption, discrete dipole approximation simulation, and exciton-coupling model. *J. Phys. Chem. B* **110**, 18243–18253 (2006).
 53. Orendorff, C. J., Gearheart, L., Jana, N. R. & Murphy, C. J. Aspect ratio dependence on surface enhanced Raman scattering using silver and gold nanorod substrates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, 165–170 (2006).
 54. Ringe, E. *et al.* Unraveling the effects of size, composition, and substrate on the localized surface plasmon resonance frequencies of gold and silver nanocubes:

- A systematic single-particle approach. *J. Phys. Chem. C* **114**, 12511–12516 (2010).
55. K. Lance Kelly, Eduardo Coronado, Lin Lin Zhao, and G. C. S. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668–677 (2003).
 56. Eom, S. Y., Ryu, S. L., Kim, H. L. & Kwon, C. H. Systematic preparation of colloidal silver nanoparticles for effective SERS substrates. *Colloid. Surface. A* **422**, 39–43 (2013).
 57. Vinod, M. & Gopchandran, K. G. Au, Ag and Au: Ag colloidal nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation as SERS substrates. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **24**, 569–578 (2014).
 58. Zhang, K. *et al.* A facile surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection of rhodamine 6G and crystal violet using Au nanoparticle substrates. *Appl. Surf. Sci.* **347**, 569–573 (2015).
 59. Ngo, Y. H., Li, D., Simon, G. P. & Garnier, G. Effect of cationic polyacrylamides on the aggregation and SERS performance of gold nanoparticles-treated paper. *J. Colloid Interf. Sci.* **392**, 237–246 (2013).
 60. Yu, Y. Y., Chang, S. S., Lee, C. L. & Wang, C. R. C. Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties. *J. Phys. Chem. B* **101**, 6661–6664 (1997).
 61. Ruan, W. *et al.* Submicron patterns obtained by thermal-induced reconstruction of self-assembled monolayer of Ag nanoparticles and their application in SERS. *Appl. Surf. Sci.* **309**, 295–299 (2014).
 62. Liang, Y. *et al.* Self-assembly of gold nanorods on wrinkled template. *Nano* **9**, No. 1450076 (2014).
 63. Ko, H. & Tsukruk, V. V. Nanoparticle-decorated nanocanals for surface-enhanced Raman scattering. *Small* **4**, 1980–1984 (2008).
 64. Hanske, C. *et al.* Solvent-Assisted Self-Assembly of Gold Nanorods into Hierarchically Organized Plasmonic Mesostuctures. *ACS Appl. Mater. Inter.* **11**,

- 11763–11771 (2019).
65. Jones, S. T. *et al.* Gold nanorods with sub-nanometer separation using cucurbit[n]uril for SERS applications. *Small* **10**, 4298–4303 (2014).
 66. De Barros, A. *et al.* Dynamic Behavior of Surface-Enhanced Raman Spectra for Rhodamine 6G Interacting with Gold Nanorods: Implication for Analyses under Wet versus Dry Conditions. *ACS Appl. Nano Mater.* **3**, 8138–8147 (2020).
 67. Liu, H. *et al.* Three-dimensional and time-ordered surface-enhanced raman scattering hotspot matrix. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5332–5341 (2014).
 68. Zhou, Q. & Kim, T. Review of microfluidic approaches for surface-enhanced Raman scattering. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **227**, 504–514 (2016).
 69. Reguera, J., Langer, J., Jiménez De Aberasturi, D. & Liz-Marzán, L. M. Anisotropic metal nanoparticles for surface enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 3866–3885 (2017).
 70. Tong, Q., Malachosky, E. W., Raybin, J., Guyot-Sionnest, P. & Sibener, S. J. End-to-end alignment of gold nanorods on topographically enhanced, cylinder forming diblock copolymer templates and their surface enhanced Raman scattering properties. *J. Phys. Chem. C* **118**, 19259–19265 (2014).
 71. Ashkar, R. *et al.* Rapid Large-Scale Assembly and Pattern Transfer of One-Dimensional Gold Nanorod Superstructures. *ACS Appl. Mater. Inter.* **9**, 25513–25521 (2017).
 72. Lee, A. *et al.* Side-by-side assembly of gold nanorods reduces ensemble-averaged SERS intensity. *J. Phys. Chem. C* **116**, 5538–5545 (2012).
 73. Ding, S. Y., You, E. M., Tian, Z. Q. & Moskovits, M. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4042–4076 (2017).
 74. Li, Y., Zhao, H., Raza, A., Clemmen, S. & Baets, R. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Based on Oblique Illumination. *IEEE J. Quantum Elect.* **56**, No. 7200108 (2020).

75. Li, S. *et al.* Hybrid plasmonic grating slot waveguide with high field enhancement for an on-chip surface-enhanced Raman scattering sensor. *Appl. Opt.* **59**, 748–755 (2020).
76. Gu, Y. *et al.* Waveguide-enhanced surface plasmons for ultrasensitive SERS detection. *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 3153–3157 (2013).
77. Michon, J., Kita, D. & Hu, J. Sensitivity comparison of free-space and waveguide Raman for bulk sensing. *J. Opt. Soc. Am. B* **37**, 2012–2020 (2020).
78. Li, N., Feng, L., Teng, F. & Lu, N. Fabrication of plasmonic cavity arrays for SERS analysis. *Nanotechnology* **28**, No. 185301 (2017).
79. Wu, S., Shen, Y. & Jin, C. Surface-enhanced Raman scattering induced by the coupling of the guided mode with localized surface plasmon resonances. *Nanoscale* **11**, 14164–14173 (2019).
80. Maimaiti, A., Patra, P. P., Jones, S., Antosiewicz, T. J. & Verre, R. Low-Loss Hybrid High-Index Dielectric Particles on a Mirror for Extreme Light Confinement. *Adv. Opt. Mater.* **8**, No. 1901820 (2020).
81. Murphy, D. V. & Brueck, S. R. J. Enhanced Raman scattering from silicon microstructures. *Opt. Lett.* **8**, 494–496 (1983).
82. Zaidi, S. H., Chu, A.-S. & Brueck, S. R. J. Optical properties of nanoscale , one-dimensional silicon grating structures. *J. Appl. Phys.* **80**, 6997–7008 (1996).
83. Balkanski, M., Wallis, R. F. & Haro, E. Anharmonic effects in light scattering due to optical phonons in silicon. *Phys. Rev. B* **28**, 1928–1934 (1983).
84. Mamichev, D. A. *et al.* Enhanced Raman scattering in grooved silicon matrix. *Phys. Status Solidi Basic Res.* **246**, 173–176 (2009).
85. Xu, D., Mao, J., He, Y. & Yeung, E. S. Size-tunable synthesis of high-quality gold nanorods under basic conditions by using H₂O₂ as the reducing agent. *J. Mater. Chem. C* **2**, 4989–4996 (2014).
86. Torgerson, W. S. Multidimensional scaling of similarity. *Psychometrika* **30**, 379–393 (1965).

87. Minghim, R., Paulovich, F. V. & de Andrade Lopes, A. Content-based text mapping using multi-dimensional projections for exploration of document collections. in *Visualization and Data Analysis 2006* vol. 6060 1–12 (2006).
88. Sammon, J. W. A Nonlinear Mapping for Data Structure Analysis. *Ieee Trans. Comput.* **18**, 401–409 (1969).
89. Paulovich, F. V., Nonato, L. G., Minghim, R. & Levkowitz, H. Least square projection: A fast high-precision multidimensional projection technique and its application to document mapping. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* **14**, 564–575 (2008).
90. Paulovich, F. V. *et al.* Information visualization techniques for sensing and biosensing. *Analyst* **136**, 1344–1350 (2011).
91. Rousseeuw, P. J. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J. Comput. Appl. Math.* **20**, 53–65 (1987).
92. Paddock, S. W. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.* **16**, 127–149 (2000).
93. Pal, P. *et al.* High speed silicon wet anisotropic etching for applications in bulk micromachining: a review. *Micro Nano Syst. Lett.* **9**, (2021).
94. Deraoui, A., Mallat, K., Cornet, A. & Defrance, P. Optical Properties of Micro and Nanostructured Bioinspired Materials. *Int. J. Opt. Appl.* **4**, 31–39 (2014).
95. Periasamy, S. *et al.* Micro-Raman Scattering of Nanoscale Silicon in Amorphous and Porous Silicon. *Zeitschrift fur Phys. Chemie* **231**, 1585–1598 (2017).
96. Long, D. A. *The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules.* (John Wiley & Sons Ltd, 2002).
97. Lu, J. *et al.* Electric Field-Modulated Surface Enhanced Raman Spectroscopy by PVDF/Ag Hybrid. *Sci. Rep.* **10**, No. 5269 (2020).
98. Mampallil, D. & Eral, H. B. A review on suppression and utilization of the coffee-ring effect. *Adv. Colloid Interface Sci.* **252**, 38–54 (2018).
99. Yang, G. *et al.* Distilling nanoscale heterogeneity of amorphous silicon using tip-

- enhanced Raman spectroscopy (TERS) via multiresolution manifold learning. *Nat. Commun.* **12**, No. 578 (2021).
100. Watanabe, H., Hayazawa, N., Inouye, Y. & Kawata, S. DFT vibrational calculations of Rhodamine 6G adsorbed on silver: Analysis of tip-enhanced Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **109**, 5012–5020 (2005).
 101. Virga, A. *et al.* Silver nanoparticles on porous silicon: Approaching single molecule detection in resonant SERS regime. *J. Phys. Chem. C* **117**, 20139–20145 (2013).
 102. Zhong, F., Wu, Z., Guo, J. & Jia, D. Porous silicon photonic crystals coated with Ag nanoparticles as efficient substrates for detecting trace explosives using SERS. *Nanomaterials* **8**, No. 872 (2018).
 103. Schwartzberg, A. M. *et al.* Unique gold nanoparticle aggregates as a highly active surface-enhanced raman scattering substrate. *J. Phys. Chem. B* **108**, 19191–19197 (2004).
 104. Wang, Y., Guo, S., Chen, H. & Wang, E. Facile fabrication of large area of aggregated gold nanorods film for efficient surface-enhanced Raman scattering. *J. Colloid Interface Sci.* **318**, 82–87 (2008).
 105. Vianna, P. G. *et al.* Graphene Oxide/Gold Nanorod Nanocomposite for Stable Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *ACS Photonics* **3**, 1027–1035 (2016).
 106. Pfeiffer, T. *et al.* Selection of bacteria and fungi for control of soilborne seedling diseases of maize. *J. Plant Dis. Prot.* **128**, 1227–1241 (2021).
 107. Sharma, V. K., Aulakh, J. S. & Malik, A. K. Thiram: Degradation, applications and analytical methods. *J. Environ. Monit.* **5**, 717–723 (2003).
 108. Cereser, C., Boget, S., Parvaz, P. & Revol, A. An evaluation of thiram toxicity on cultured human skin fibroblasts. *Toxicology* **162**, 89–101 (2001).
 109. Mathieu, C., Duval, R., Xu, X., Rodrigues-Lima, F. & Dupret, J. M. Effects of pesticide chemicals on the activity of metabolic enzymes: Focus on thiocarbamates. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**, 81–94 (2015).

110. Salam, S., Arif, A. & Mahmood, R. Thiram-induced cytotoxicity and oxidative stress in human erythrocytes: an in vitro study. *Pestic. Biochem. Physiol.* **164**, 14–25 (2020).
111. Wang, S. Y. *et al.* Application of surface-enhanced Raman spectroscopy using silver and gold nanoparticles for the detection of pesticides in fruit and fruit juice. *Trends Food Sci. Technol.* **116**, 583–602 (2021).
112. Zhang, Y., Zhu, A., Wang, Y. & Zhang, X. Plasmonic structure with nanocavity cavities for SERS detection of pesticide thiram. *Nanotechnology* **32**, 11–18 (2021).
113. Verma, A. K. & Soni, R. K. Multi-spiked silver stars for ultrasensitive and multiplexed SERS detection of analytes. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **54**, (2021).
114. Creighton, J. A. Surface Raman electromagnetic enhancement factors for molecules at the surface of small isolated metal spheres: the determination of adsorbate orientation from SERS relative intensities. *Surf. Sci.* **124**, 209–219 (1983).
115. Lombardi, J. R. & Birke, R. L. A unified approach to surface-enhanced raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **112**, 5605–5617 (2008).
116. Li, P., Liu, H., Yang, L. & Liu, J. The time-resolved D-SERS vibrational spectra of pesticide thiram. *Talanta* **117**, 39–44 (2013).
117. Chen, J. *et al.* Flexible and Adhesive Surface Enhance Raman Scattering Active Tape for Rapid Detection of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. *Anal. Chem.* **88**, 2149–2155 (2016).
118. Dowgiallo, A. M. & Guenther, D. A. Determination of the Limit of Detection of Multiple Pesticides Utilizing Gold Nanoparticles and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 12642–12651 (2019).
119. Oliveira, M. J. S. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering of thiram: Quantitative and theoretical analyses. *J. Raman Spectrosc.* **52**, 2557–2571 (2021).
120. Ivanov, E., Ando, R. A. & Corio, P. Solid-liquid-liquid extraction as an approach

- to the sensitive detection of a hydrophobic pollutant through surface-enhanced Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **87**, 116–122 (2016).
121. Sánchez-Cortés, S., Domingo, C., García-Ramos, J. V. & Aznárez, J. A. Surface-enhanced vibrational study (SEIR and SERS) of dithiocarbamate pesticides on gold films. *Langmuir* **17**, 1157–1162 (2001).
 122. Bhavya, M. B. *et al.* Femtomolar detection of thiram: via SERS using silver nanocubes as an efficient substrate. *Environ. Sci. Nano* **7**, 3999–4009 (2020).
 123. Wang, T. *et al.* Fabrication of 2D titanium carbide MXene/Au nanorods as a nanosensor platform for sensitive SERS detection. *Ceram. Int.* **47**, 30082–30090 (2021).
 124. Lee, D. J. & Kim, D. Y. 3D hotspot matrix of Au nanoparticles on Au island film with a spacer layer of dithiol molecules for highly sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sci. Rep.* **11**, 1–9 (2021).
 125. Saute, B., Premasiri, R., Ziegler, L. & Narayanan, R. Gold nanorods as surface enhanced Raman spectroscopy substrates for sensitive and selective detection of ultra-low levels of dithiocarbamate pesticides. *Analyst* **137**, 5082–5087 (2012).
 126. Li, J. J. *et al.* Synthesis and SERS activity of super-multibranched Au–Ag nanostructure via silver coating-induced aggregation of nanostars. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **204**, 380–387 (2018).
 127. Wang, S. *et al.* Facile and robust fabrication of hierarchical Au nanorods/Ag nanowire SERS substrates for the sensitive detection of dyes and pesticides. *Anal. Methods* **14**, 1041–1050 (2022).
 128. Xing, C. *et al.* Two-dimensional flower-shaped Au@Ag nanoparticle arrays as effective SERS substrates with high sensitivity and reproducibility for detection of thiram. *J. Mater. Chem. C* **8**, 3838–3845 (2020).
 129. Kumar, G. & Soni, R. K. Silver Nanocube- and Nanowire-Based SERS Substrates for Ultra-low Detection of PATP and Thiram Molecules. *Plasmonics* **15**, 1577–1589 (2020).
 130. Verma, A. K. & Soni, R. K. Ultrasensitive surface-enhanced Raman

- spectroscopy detection of explosive molecules with multibranched silver nanostructures. *J. Raman Spectrosc.* (2022).
131. Ahmed, W., Demirtaş, Ö., Öztürk, İ. M. & Bek, A. Monolayer Assembly of MultiSpiked Gold Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Trace Detection of Dyes and Explosives. *ACS Appl. Nano Mater.* **3**, 6766–6773 (2020).
 132. Nalbant Esenturk, E. & Hight Walker, A. R. Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy via gold nanostars. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 86–91 (2009).
 133. Zheng, X. *et al.* High performance Au/Ag core/shell bipyramids for determination of thiram based on surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.* **43**, 1374–1380 (2012).
 134. Kang, H. *et al.* Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities. *Chem. Rev.* **119**, 664–699 (2019).