

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais
(POSMAT)

Deteccção de contaminantes emergentes em meio aquoso
via espalhamento Raman amplificado em superfície
(SERS)

Marcelo José dos Santos Oliveira

Presidente Prudente/SP

2023

Marcelo José dos Santos Oliveira

**Detecção de contaminantes emergentes em meio aquoso via
espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS)**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre junto à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT), área de Ciência dos Materiais, sob orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino e a coorientação do Dr. Rafael Jesus Gonçalves Rubira.

Presidente Prudente/SP
2023

O48d

Oliveira, Marcelo José dos Santos

Detecção de contaminantes emergentes em meio aquoso via espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS) / Marcelo José dos Santos Oliveira. -- Presidente Prudente, 2021

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino

Coorientador: Rafael Jesus Gonçalves Rubira

1. SERS. 2. Detecção. 3. Tiabendazol. 4. Mecanismo de agregação.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARCELO JOSÉ DOS SANTOS OLIVEIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 31 dias do mês de agosto do ano de 2023, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARCELO JOSÉ DOS SANTOS OLIVEIRA, intitulada **Detecção de contaminantes emergentes em meio aquoso via espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS)**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia - Unesp/Campus de Presidente Prudente, Prof. Dr. LEONARDO NEGRI FURINI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Universidade Federal de Santa Catarina, Prof. Dr. AUGUSTO BATAGIN NETO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências e Tecnologia / Instituto de Ciências e Engenharia - Unesp/ Câmpus de Itapeva . Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pelo discernimento e força que Ele tem me dado nos momentos difíceis.

À minha mãe, que com toda a sua garra e força de vontade, mesmo diante de todas as circunstâncias pelas quais passamos, nunca desistiu e me ajudou a chegar até aqui.

Aos meus avós, que são sinônimos de carinho e afeto, e que são o meu porto seguro.

À minha noiva, a pessoa que ouve todas as minhas angústias e lamentações, e que é o meu porto seguro, em quem realmente posso confiar. Ela, durante toda esta jornada, esteve ao meu lado dando suporte para que eu pudesse chegar até aqui. Eu te amo.

À minha família, irmãos, tias, tios, sogros e primos, que sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado durante todo esse tempo.

Um agradecimento especial ao meu tio Marcelo, que no início desta carreira acadêmica, me apoiou e incentivou para que eu não desistisse desta jornada.

Ao meu orientador, Casé, que além de ser um excelente professor e orientador, é uma pessoa incrível e um exemplo de orientador, professor e pai. Tenho muito a agradecer por todo o ensinamento, tempo dedicado a me orientar, por todas as conversas e conselhos. O senhor é um espelho de ser humano para mim.

Ao Rafa, meu coorientador, que teve um papel importante no meu desenvolvimento na pesquisa. Só tenho a agradecer por todas as conversas e cafezinhos que tivemos durante esse tempo.

Ao Santiago, por me ter recebido tão bem em Madri e por ter me feito sentir em casa. Agradeço por todos os ensinamentos e passeios que fizemos juntos.

Ao professor Neto, pela ajuda com os cálculos teóricos que enriquecem os nossos trabalhos.

Aos amigos do grupo Noix, com os quais formei uma grande amizade: Wally, Leo, Gi, Cibs, Diegão, Gui, Henry e Lu. Vocês sempre me motivaram e são uma inspiração para mim. Obrigado por todas as conversas, conselhos e as conversas de boteco, além de me ajudarem, tanto na parte acadêmica quanto na vida. Vocês são muito importantes na minha vida. Todos os demais integrantes do grupo Noix, que tornam o dia a dia no laboratório mais fácil.

A todos os amigos da graduação, que foram essenciais no meu desenvolvimento acadêmico, pelos momentos de descontração e pelos trucos vencidos por mim, já que eu nunca perdi em Prudente.

Aos amigos da república, Rafa, Gui, Andressa e Douglas. Foi muito bom passar boa parte do tempo dividindo ap com vocês.

À FAPESP e à CAPES, pelo apoio financeiro.

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

O presente trabalho foi realizado com financiamento de bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES-PROEX), processo nº 88887.601722/2021-00.

E da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2021/05460-6 e processo BEPE nº 2022/09619-2. Vinculado aos processos nº 2021/14235-6 e nº 2018/22214-6.

"As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP".

“A persistência é o menor caminho do êxito.”
Charlie Chaplin

OLIVEIRA, Marcelo J. S. **Detecção de contaminantes emergentes em meio aquoso via espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS)**. 2023. 72f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2023.

Resumo.

O nível de agregação das nanopartículas metálicas é um dos fatores que influenciam a detecção de substâncias de interesse através da técnica de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS), podendo afetar a reprodutibilidade e a sensibilidade das análises. Neste contexto, este trabalho teve como foco avaliar o efeito de dois métodos de preparo de amostras (adição de padrão externo (APE) e adição múltipla de padrão (AMP)) para detecção do fungicida tiabendazol (TBZ) como molécula alvo por meio da técnica SERS utilizando coloide de prata (AgNPs). Foi possível verificar por espectroscopia de extinção no UV-Vis, potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) que em ambos os métodos o TBZ induziu significativa agregação coloidal, porém com diferenças a se destacar. A concentração para a qual é induzida intensa agregação (concentração crítica - cc) foi de $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L para o método APE e $2,3 \times 10^{-6}$ mol/L para o método AMP. As isotermas de adsorção obtidas via SERS (intensidade SERS vs concentração de TBZ) apresentaram uma correspondência direta com a agregação coloidal. Em ambos os métodos (APE e AMP), e para baixas concentrações ($< cc$), há a formação de uma camada de TBZ, cuja adsorção é favorecida pelo aumento da concentração de TBZ (“adsorção cooperativa”). Porém, em altas concentrações ($> cc$), a isoterma de adsorção atinge um patamar para o método APE (excesso de TBZ disperso no coloide e possível formação de multicamadas) e uma queda abrupta para o método AMP (degradação da dispersão coloidal/precipitação). Em termos da morfologia dos agregados, o método APE em baixas concentrações apresentou agregados mais compactos com dimensões de até 500 nm e em altas concentrações agregados mais ramificados e superiores a 2 μm . Já o método AMP em baixas concentrações apresentou agregados mais ramificados com dimensões de até 2 μm e em altas concentrações agregados mais compactos e superiores a 2 μm . Portanto, a partir destes aspectos morfológicos em função da concentração de TBZ, e considerando os mecanismos DLCA (*diffusion-limited colloid aggregation* – agregação coloidal limitada pela difusão das AgNPs) e RLCA (*reaction-limited colloid aggregation* – agregação coloidal limitada pela interação entre as AgNPs), pode-se inferir que o método APE segue o mecanismo RLCA de agregação em baixas concentrações e DLCA em altas concentrações. Em contrapartida, o oposto ocorreria para o método AMP. Por fim, em termos quantitativos, apesar das diferenças supracitadas e sob as mesmas condições experimentais, os limites de detecção do TBZ para ambos os métodos foram muito próximos (método APE: $5,9 \times 10^{-8}$ mol/L; método AMP: $4,9 \times 10^{-8}$ mol/L).

Palavras chaves: SERS; detecção; tiabendazol; mecanismos de agregação, métodos de adição.

Abstract

The level of aggregation of metallic nanoparticles is one of the factors influencing the detection of substances of interest through the technique of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), which can impact the reproducibility and sensitivity of analyses. In this context, this study aimed to evaluate the effects of two sample preparation methods (external standard method (ESM) and standard addition method (SAM)) for detecting the fungicide thiabendazole (TBZ) as the target molecule using the SERS technique with silver colloids (AgNPs). By employing extinction spectroscopy in UV-Vis, zeta potential measurements, dynamic light scattering (DLS), and transmission electron microscopy (TEM), it was observed that both methods induced significant colloidal aggregation of TBZ, albeit with distinct characteristics. The critical concentration (cc) at which intense aggregation occurred was determined to be 9.0×10^{-6} mol/L for the ESM method and 2.3×10^{-6} mol/L for the SAM method. Adsorption isotherms obtained via SERS (plotting SERS intensity against TBZ concentration) exhibited a direct correlation with colloidal aggregation. In both the APE and AMP methods, at low concentrations ($< cc$), a TBZ layer was formed, with adsorption favored by increased TBZ concentration (referred to as "cooperative adsorption"). However, at higher concentrations ($> cc$), the adsorption isotherm plateaued for the ESM method (indicating an excess of TBZ dispersed in the colloid, possibly leading to multilayer formation) and exhibited a sharp decline for the SAM method (indicating degradation of colloidal dispersion or precipitation). Regarding aggregate morphology, the ESM method at low concentrations exhibited more compact aggregates measuring up to 500 nm, while at high concentrations, the aggregates were more branched and exceeded 2 μm in size. Conversely, the SAM method displayed more branched aggregates at low concentrations, with dimensions of up to 2 μm , and more compact aggregates exceeding 2 μm at high concentrations. From these morphological observations, in relation to TBZ concentration and considering the diffusion-limited colloid aggregation (DLCA) and reaction-limited colloid aggregation (RLCA) mechanisms, it can be inferred that the ESM method follows the RLCA mechanism at low concentrations and DLCA at high concentrations, whereas the reverse is true for the SAM method. Lastly, in quantitative terms, despite the aforementioned differences and under identical experimental conditions, the limits of detection for TBZ were very similar for both methods (ESM method: 5.9×10^{-8} mol/L; SAM method: 4.9×10^{-8} mol/L).

Keywords: SERS; Detection, Thiabendazole, aggregation mechanisms, addition methods.

Lista de Figuras

Figura 1: estrutura química do TBZ.....	20
Figura 2: preparo das diluições do TBZ em diversas concentrações (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} mol/L). Na solução 10^{-2} mol/L o TBZ é dissolvido em etanol. Em 10^{-3} mol/L a solução possui 10% de etanol em água, em 10^{-4} mol/L possui 1% de etanol e em 10^{-5} mol/L possui 0,1% de etanol. Estas soluções com TBZ ainda serão diluídas em coloide de Ag.	20
Figura 3: esquema do método de adição AMP.	22
Figura 4: esquema do método de adição APE.	22
Figura 5: esquema do preparo da amostra para a realização das medidas de UV-Vis, DLS e potencial zeta. No método APE o coloide de Ag + TBZ é descartado ao final de cada medida e repete-se o processo de preparo da amostra para uma nova alíquota de TBZ. No método AMP utiliza-se o mesmo coloide de Ag + TBZ para as adições subsequentes de TBZ.	23
Figura 6: esquema do preparo da amostra para as medidas SERS. No método APE o coloide de Ag + TBZ é descartado ao final de cada medida e repete-se o processo de preparo da amostra para uma nova alíquota de TBZ. No método AMP utiliza-se o mesmo coloide de Ag + TBZ.	26
Figura 7: representação da forma como as amostras foram preparadas para obtenção das imagens de MET.	28
Figura 8: espectros SERS do coloide de Ag na presença e ausência de 20 μ L de etanol e espectro Raman do TBZ em água e etanol (10^{-4} mol/L). Laser: 785 nm. Espectros nas mesmas condições experimentais, com correção de linha de base, colocados no zero de intensidade (offset correction) e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”).	
Coloide S2	29
Figura 9: espectros Raman do TBZ em pó (em preto), espectro SERS do TBZ $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L pelo método APE (em vermelho) e espectro SERS do TBZ $1,2 \times 10^{-6}$ mol/L pelo método AMP (azul escuro). Todos os espectros foram obtidos com o laser 785 nm. Os números de onda destacados em cores diferentes guardam correlação destas cores com os grupos químicos da molécula de TBZ em destaque (inset: verde = grupo benzimidazol e rosa = grupo tiazol). Espectros com correção de linha de base e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”).	30
Figura 10: reatividade local de dois confômeros TBZ (CF1 e CF2) em água: as cores vermelha e azul representam regiões reativas e inertes, respectivamente, em relação a nucleófilos (f^+), eletrófilos (f^-) e radicais livres ($1/2 [f^+ + f^-]$). Cada molécula tem sua própria escala de cores RGB. R: red, G: green e B: blue.	33
Figura 11: estrutura molecular do TBZ em diferentes pHs. Adaptado de M. Jalil et al [29].	35
Figura 12: espectros SERS/APE do TBZ nas concentrações de $9,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Os espectros foram obtidos com 10% de intensidade do laser até a concentração de $6,0 \times 10^{-7}$ mol/L, a partir da concentração de $9,0 \times 10^{-7}$ mol/L foram obtidos com 1% de intensidade devido à saturação do sinal SERS. Espectros com correção de linha de base e colocados no 0 eixo y (offset correction). Laser 785 nm. Coloide S2.	36
Figura 13: espectros SERS do coloide de Ag e do TBZ nas concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L para o método APE. Espectros com correção de linha de base e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”). Laser 785 nm.	37
Figura 14: intensidade SERS dada pelos valores da intensidade da banda em 1011 cm^{-1} vs log da concentração de TBZ em A) todas as concentrações de $6,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L, com a primeira concentração que apresenta espectro do TBZ ($3,0 \times 10^{-7}$ mol/L) e com sinal mais intenso ($6,0 \times 10^{-6}$ mol/L) circuladas em vermelho. B) Região em baixas concentrações	

6,0x10 ⁻⁸ a 1,0x10 ⁻⁷ mol/L e C) altas concentrações de 3,0x10 ⁻⁶ a 1,0x10 ⁻⁴ mol/L pelo método APE.	38
Figura 15: isothermas de adsorção propostas pelo modelo B.D.D.T, adaptado de Brunauer et al. [34].	39
Figura 16: espectros SERS/AMP do TBZ nas concentrações de 9,9x10 ⁻⁹ a 3,2x10 ⁻⁵ mol/L. As concentrações de 9,9x10 ⁻⁹ a 5,9x10 ⁻⁷ foram excitadas com 10 % da intensidade do laser. A partir da concentração de 9,7x10 ⁻⁷ foram excitadas com 1% da intensidade devido a saturação do sinal SERS. Espectros com correção de linha de base e colocados no 0 eixo y (offset correction). Laser 785 nm.	40
Figura 17: espectros SERS/AMP do coloide de Ag e do TBZ nas concentrações de 6,9x10 ⁻⁸ a 2,3x10 ⁻⁵ mol/L. Espectros com correção de linha de base e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”). Laser 785 nm.	41
Figura 18: valores da intensidade da banda em 1011 cm ⁻¹ vs log da concentração de TBZ de A) todas concentrações de 9,9x10 ⁻⁹ a 3,2x10 ⁻⁵ mol/L, com a primeira concentração que apresenta espectro do TBZ (1,2x10 ⁻⁷ mol/L) e com sinal mais intenso (1,5x10 ⁻⁶ mol/L) circuladas em vermelho. B) Região em baixas concentrações 9,9x10 ⁻⁹ a 9,7x10 ⁻⁷ mol/L e C) altas concentrações de 1,5x10 ⁻⁶ a 3,1x10 ⁻⁵ mol/L pelo método AMP.	42
Figura 19: sistema de classificação de isotérmicas de Giles et al. [35]. Detalhe: ilustração esquemática das condições que favorecem a geração das isothermas S e L. Solute polar monofuncional sobre substrato polar em solvente polar. Uma molécula de soluto é mais estável adsorvida em “a”, adjacente a outras moléculas já adsorvidas, do que isoladamente em “b”. Resultado: isoterma S. Adaptado de Giles et al. [35].	43
Figura 20: A) espectros de extinção no UV-Vis do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ nas concentrações de 1,0x10 ⁻⁸ a 1,0x10 ⁻⁴ mol/L adicionado pelo método APE. Linha de base para amostra com coloide de Ag: cubeta de quartzo com água ultrapura. B) Extinção vs concentração de TBZ (mol/L) para as bandas em 405 (AgNPs isoladas) e 798 nm (AgNPs agregadas) para o método APE. C) Imagens (a partir de fotos de celular) do coloide de Ag para diversas concentrações de TBZ do método APE, com as concentrações utilizadas para as imagens TEM marcadas com uma esfera vermelha.	45
Figura 21: A) espectros de extinção no UV-Vis do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ nas concentrações de 6,9x10 ⁻⁸ a 3,2x10 ⁻⁵ mol/L adicionado pelo método AMP. Linha de base para amostra com coloide de Ag: cubeta de quartzo com água ultrapura. B) extinção vs concentração de TBZ (mol/L) para as bandas em 405 (AgNPs isoladas) e 798 nm (AgNPs agregadas) para o método AMP. C) Imagens (a partir de fotos de celular) do coloide de Ag para diversas concentrações de TBZ do método AMP, com as concentrações utilizadas para as imagens TEM marcadas com uma esfera vermelha.	47
Figura 22: diâmetro médio das AgNPs (e seus agregados) + TBZ vs log da concentração de TBZ (método APE). Concentrações de TBZ listadas na Tabela 7.	50
Figura 23: diâmetro médio das AgNPs (e seus agregados) + TBZ vs log da concentração de TBZ (método AMP). Concentrações de TBZ listadas na Tabela 8.	52
Figura 24: A) média do potencial zeta das AgNPs (e seus agregados) em mV vs log da concentração de TBZ (método APE). Concentrações de TBZ listadas na Tabela 10. B) média do potencial zeta das AgNPs (e seus agregados) em mV vs log da concentração de TBZ (método AMP). Concentrações de TBZ listadas na Tabela 10.	54
Figura 25: A) imagens de microscopia MET do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ nas mesmas concentrações dos espectros de extinção. e B) espectros de extinção do coloide de Ag na ausência (preto) e presença de TBZ em baixas concentrações 3,0x10 ⁻⁸ , 3,0x10 ⁻⁷ e 6,0x10 ⁻⁶ mol/L (amarelo), na concentração crítica 9,0x10 ⁻⁶ mol/L (vermelho) e em altas concentrações 6,0x10 ⁻⁵ e 1,0x10 ⁻⁴ mol/L (verde). As medidas de A e B foram realizadas pelo método APE. C) Imagens de microscopia MET do coloide de Ag na ausência	

e presença de TBZ nas mesmas concentrações dos espectros de extinção. e D) espectros de extinção do coloide de Ag na ausência (preto) e presença de TBZ em baixas concentrações $6,9 \times 10^{-8}$, $5,9 \times 10^{-7}$ e $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L (amarelo), na concentração crítica $2,3 \times 10^{-6}$ mol/L (vermelho) e em altas concentrações $9,7 \times 10^{-6}$ e $3,1 \times 10^{-5}$ mol/L (verde). As medidas de C e D foram realizadas pelo método AMP.	59
Figura 26: imagens de microscopia MET do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ nas mesmas concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$, $6,0 \times 10^{-6}$ e $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L, realizadas pelo método APE.	60
Figura 27: A) espectros SERS do TBZ nas concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$ a $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L, na faixa de 200 a 400 cm^{-1} , com os espectros plotados com linha de base. São dadas ainda as intensidades da banda em 247 cm^{-1} (espectros obtidos nas mesmas condições experimentais). B) Concentrações de $6,0 \times 10^{-8}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L na região entre 200 e 280 cm^{-1} com os espectros plotados em escala sem alteração no espectro. C) Intensidade SERS dada pelos valores da intensidade da banda em 247 cm^{-1} vs log da concentração de TBZ em todas as concentrações de $6,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L.	62
Figura 28: estrutura molecular da A) quinacrina estudada por Rivas et al. [47], B) derivado de ditiocarbamato calix[4]areno estudada por Guerrini et al. [48] e C) histamina do ácido lipóico estudada por Matulaitiene et al. [49].	64
Figura 29: A) espectros SERS do TBZ nas concentrações de $6,9 \times 10^{-8}$ a $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L, na faixa de 200 a 400 cm^{-1} , com os espectros plotados com linha de base. São dadas ainda as intensidades da banda em 247 cm^{-1} (espectros obtidos nas mesmas condições experimentais). B) Concentrações de $6,9 \times 10^{-8}$ a $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L na região entre 200 e 280 cm^{-1} com os espectros plotados em escala sem alteração no espectro. C) Intensidade SERS dada pelos valores da intensidade da banda em 247 cm^{-1} vs log da concentração de TBZ em todas as concentrações de $9,9 \times 10^{-9}$ a $3,2 \times 10^{-5}$ mol/L.	65
Figura 30: espectros SERS com laser 532 nm nas concentrações de $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L no método APE, $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L no método AMP e espectro Raman do pó de TBZ. Espectros SERS com laser 785 nm nas concentrações de $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L no método APE, $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L no método AMP e espectro Raman do pó de TBZ. Todos os espectros foram obtidos com 10% de intensidade do laser, 1 de acumulação e 10 segundos de exposição. Espectros com correção de linha de base e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”).	66
Figura 31: espectros de extinção do coloide de Ag na presença e ausência de TBZ na concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L e espectro de absorção do TBZ em água na concentração de 10^{-4} mol/L. Inset com os espectros SERS do TBZ na concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L nos lasers 532 nm (em verde), 633 nm (em laranja) e 785 nm (em vermelho). Os espectros do inset foram obtidos com 10% de intensidade do laser, 1 de acumulação e 10 segundos de exposição. Espectros normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”).	69

Lista de Tabelas

Tabela 1: valores referentes às concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas de UV-Vis para o método AMP.	23
Tabela 2: valores referentes às concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas de DLS e potencial zeta para o método AMP.	24
Tabela 3: valores referentes às concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas de UV-Vis, DLS e potencial zeta para o método APE.	24
Tabela 4: valores referentes as concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas SERS do TBZ para o método AMP.	26
Tabela 5: valores referentes as concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas SERS do TBZ para o método APE.	27
Tabela 6: atribuições vibracionais do espectro Raman do pó do TBZ e espectro SERS do TBZ em coloide de Ag.	31
Tabela 7: valores do diâmetro (d) das AgNPs (e seus agregados) na ausência e presença de TBZ obtidos via DLS (método APE). Coloide S3.	49
Tabela 8: valores do diâmetro (d) das AgNPs (e seus agregados) na ausência e presença de TBZ obtidos via DLS (método AMP). Coloide S1	51
Tabela 9: valores de potencial Zeta das AgNPs (e seus agregados) na ausência e presença de TBZ (método APE).	53
Tabela 10: valores de potencial Zeta das AgNPs (e seus agregados) na ausência e presença de TBZ (método AMP).	53

Sumário

1. Introdução.....	15
1.1. Motivação	15
1.2. Mecanismos de agregação das NP: DLCA e RLCA	16
2. Objetivos.....	19
3. Procedimento experimental.....	20
3.1. Preparação das amostras de tiabendazol (TBZ)	20
3.2. Síntese do coloide de Ag por redução de hidroxilamina hidroclorada	21
3.3. Método de preparo da adição múltipla de padrão (AMP) e adição padrão externo (APE)	21
3.4. Caracterização do coloide de Ag: UV-Vis, DLS e potencial zeta	22
3.5. Medidas SERS	25
3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	27
4. Resultados e discussões	29
4.1. Espalhamento SERS aplicado à detecção de TBZ (métodos APE e AMP)	29
4.2. Análise quantitativa	35
4.2.1. Medidas SERS em diferentes concentrações utilizando o método APE	35
4.2.2. Medidas SERS em diferentes concentrações utilizando o método AMP	39
4.3. Medidas de extinção no UV-Vis em ambos os métodos APE e AMP	45
4.4. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ pelos métodos APE e AMP	48
4.5. Imagens de MET em ambos os métodos APE e AMP	56
4.6. Atribuição da banda em 247 cm^{-1} nos espectros SERS do TBZ	61
4.7. Influência dos diferentes lasers nas medidas SERS	66
5. Conclusão.....	70
6. Referências.....	72

1. Introdução

1.1. Motivação

As pesquisas relacionadas à técnica de espalhamento Raman amplificado em superfície (do inglês *surface-enhanced Raman scattering* – SERS) crescem ao longo dos anos devido às vantagens que a técnica proporciona, como baixo custo relativo, métodos de preparação simples, além da alta sensibilidade e seletividade, características necessárias em uma aplicação sensorial. A técnica SERS utiliza nanopartículas (NPs) metálicas (Au, Ag e Cu para lasers de excitação no visível) como "substratos SERS", que podem amplificar o sinal de Raman em até 10^{10} em situações específicas, como os chamados *hot spots* (pontos intersticiais nos agregados de nanopartículas) [1], podendo realizar análises em baixas concentrações, incluindo a detecção de molécula única [2,3].

Porém, as flutuações na intensidade do sinal SERS ainda são um dos desafios para aplicação rotineira da técnica como ferramenta analítica. Estão relacionadas com a homogeneidade do substrato SERS em termos de morfologia, tamanho e distribuição espacial das nanopartículas metálicas (agregação), bem como com a interação dos analitos (adsorbatos) em diferentes regiões dos agregados de nanopartículas. No caso dos *hot spots*, por exemplo, se por um lado tais regiões apresentam um forte campo elétrico responsável por um intenso aumento do sinal Raman [4,5], por outro, porém, podem ser também responsáveis pela baixa reprodutibilidade na intensidade do sinal.

Portanto, para melhorar a reprodutibilidade da técnica, sem perder sua capacidade de amplificação, além das modificações realizadas nas suspensões coloidais, é possível utilizar substratos SERS sólidos [6]. Nosso grupo de pesquisa vem utilizando suspensões coloidais desde 2015, a partir de uma colaboração com o Dr. Santiago Sanches Cortez pesquisador do Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC) em Madri, Espanha [7], quando passamos não só a buscar a aplicação analítica da técnica SERS [8], como também a determinar os mecanismos de interação analito/nanopartícula metálica [9,10].

A agregação das nanopartículas é um dos principais fatores para a amplificação do sinal SERS devido à proximidade das NPs produzirem os *hot spots*. O trabalho de Vesga *et al.* [11], mostra a influência na intensidade SERS da agregação das NPs com a glicina favorecendo a agregação das NPs [11]. Vesga *et al.* analisaram a influência do pH e o tempo de adsorção da molécula na agregação das NPs através da técnica de absorção no UV-Vis e espalhamento dinâmico de luz. Os autores observaram que em concentrações mais altas (50

e 100 g/kg) com o pH 4, ocorre maior agregação das NPs e, consequentemente, um melhor sinal SERS em intensidade [11].

1.2. Mecanismos de agregação das NP: DLCA e RLCA

De acordo com Lin *et al.* [12], as suspensões coloidais são estabilizadas por grupos carregados adsorvidos na sua superfície, os quais formam uma barreira repulsiva nas nanopartículas que impede que ocorra o processo de agregação. O processo de agregação seria determinado pela probabilidade (P), dada por $P \propto e^{-(E_b/kT)}$, sendo E_b o valor da barreira repulsiva. Para que o coloide não agregue, o valor de E_b deve ser muito maior que kT [12]. Os mecanismos de agregação abordados por Lin *et al.* [12] são dois: agregação coloidal limitada por difusão (do inglês *diffusion-limited colloid aggregation* - DLCA) e agregação coloidal limitada por reação (do inglês *reaction-limited colloid aggregation* - RLCA). Cada mecanismo possui características distintas, porém, em ambos mecanismos os agregados formados são fractais [12].

No primeiro mecanismo DLCA a barreira repulsiva que envolve a nanopartícula é totalmente removida ($E_b \ll kT$, $P \approx 1$), proporcionando um número elevado de colisões entre as partículas ou agregado, sendo que todas as partículas que colidem formam agregados, sendo uma agregação rápida. Dessa forma, a taxa de agregação é limitada apenas pelo tempo entre colisões induzidas pela difusão. No mecanismo DLCA, a remoção da barreira repulsiva na prática se dá utilizando-se uma alta concentração de adsorbato (analito), os quais, após adsorverem na superfície das nanopartículas, promovem a remoção da barreira repulsiva pela troca dos íons adsorvidos na superfície das nanopartículas (oriundos da síntese coloidal) pelo adsorbato (eletricamente neutros), facilitando a formação de agregados.

Já para o mecanismo RLCA ocorre a diminuição da barreira repulsiva apenas em poucas regiões ($E_b > kT$, $P \ll 1$), portanto, para que haja a agregação deve-se ter um grande número de colisões antes que duas partículas ou agregados se unam sendo esta uma

agregação lenta [12]. O mecanismo RLCA ocorre em baixas concentrações de analito, fazendo assim que pequenas quantidades de nanopartículas sejam recobertas.

No trabalho de Lin *et al.* [12], os autores realizaram medidas com 3 coloides diferentes: nanopartículas de Au, nanopartículas de sílica e nanopartículas de látex de poliestireno, além de realizarem simulação computacional. Os autores realizaram medidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos 3 coloides para estudar o tipo de agregado que formariam, relacionando-os com os mecanismos DLCA e RLCA. Para o coloide de Au reduzido com citrato utilizaram a piridina (molécula neutra) para promover a agregação, sendo assim, para induzirem o mecanismo DLCA foi adicionada uma concentração de 10^{-2} mol/L e para o mecanismo RLCA foi adicionado 10^{-4} mol/L. No coloide de sílica reduzido por OH^- ou SiO^- , a agregação foi induzida por NaCl, em alta concentração (1,7 mol/L), onde o mecanismo atuante é o DLCA, e em baixa concentração (0,6 mol/L) para o RLCA. Por fim no látex de poliestireno reduzido por adsorção de ácido carboxílico, a fim de induzir o mecanismo DLCA foi adicionado 1,2 mol/L de HCl enquanto que o RLCA foi adicionado 0,2 mol/L de NaCl. Nesse trabalho os autores apresentaram as imagens dos agregados formados por cada coloide e denominaram o mecanismo DLCA como agregados mais abertos e ramificados com um baixo valor de dimensão fractal ($d_f \approx 1,8$) e $M_{\text{médio}}$ crescendo linearmente com o tempo. No mecanismo RLCA os agregados são mais compactos com maior valor de dimensão fractal ($d_f \approx 2,1$) e $M_{\text{médio}}$ crescendo exponencialmente com o tempo.

Em outro estudo publicado no livro “*Amplificación plasmónica de espectros Raman y de fluorescencia: SERS y SEF sobre nanoestructuras metálicas*” por Aroca *et al.* [13], os autores realizaram medidas de absorção no UV-Vis e analisaram imagens MET de nanopartículas de prata utilizando dimetilcitosina (molécula neutra) para determinar os mecanismos de agregação. Neste trabalho há uma divergência entre os mecanismos de

agregação citados por Lin *et al.*[12]. No trabalho de Aroca *et al.*[13], temos os seguintes resultados:

- Em altas concentrações de analito há a diminuição da densidade de carga. Tal diminuição contribui para a agregação limitada por difusão (DLCA) resultando em agregados compactos ($D_f > 2$) com bandas de extinção em menores comprimentos de onda.
- Em baixas concentrações de analito não há uma diminuição considerável da densidade de carga, o que contribui para a agregação limitada por reação (RLCA), resultando em agregados ramificados ($D_f < 2$) com bandas de extinção em maiores comprimentos de onda.

Portanto, ambos autores concordam na descrição dos mecanismo DLCA e RLCA, contudo nota-se diferença entre os formatos dos agregados formados em cada método. Lin *et al.*[12], associa a formação de agregados ramificados com o mecanismo DLCA, enquanto que Aroca *et al.* [13], à formação dos agregados compactos. Já no RLCA Lin *et al.* .[12], atribui o mecanismo à formação de agregados compactos. Porém, Aroca *et al.* [13], associa este mecanismo à formação de agregados mais ramificados. Vale ressaltar que, em ambos os trabalhos foi utilizado o mesmo método de adição, chamado método de adição padrão externo, ou seja, cada alíquota da solução do analito é adicionada a uma alíquota de coloide, além dos analitos utilizados para promover a agregação coloidal serem neutras.

Adicionalmente, o trabalho de Darby & Le Ru demonstram que o modo de preparo das amostras influencia no sinal SERS [14]. Os autores compararam dois métodos de adição de dois analitos distintos (rodamina 6G e azul do Nilo A) ao coloide de prata reduzido com citrato (AgCT): i) adição de um pequeno volume do analito concentrado (Large Dilution Factor - LDF), exemplo: 10 μ L de analito na concentração de 10 μ M em 990 μ L de coloide de AgCT e ii) adição do analito diluído em um volume equivalente do coloide (Half-Half

Dilution – HHD), exemplo: 500 μL de analito na concentração 200 nM em 500 μL de coloide de AgCT; em ambos os casos mantendo a mesma concentração final do analito nas soluções (0,1 μM). Neste trabalho foi possível observar que o método de adição HHD se mostrou mais eficaz em termos de amplificação, a qual foi aproximadamente 4,5 vezes maior do que o método LDF. Os autores atribuíram o melhor desempenho do método HHD ao processo de cinética de adsorção do analito às nanopartículas ser mais rápida do que o processo de difusão molecular do analito no meio coloidal. Porém, ressalta-se que o resultado pode variar de acordo com a molécula sendo avaliada devido à afinidade da molécula pela superfície das NPs. Assim, podemos observar que diferentes preparos das amostras podem influenciar diretamente no sinal SERS.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo avançar no estudo de como os processos de preparação de amostra (adição padrão externo – APE e adição múltipla de padrão – AMP) afetam a formação de agregados em sistemas coloidais (morfologia: tamanho e formato), relacionando-os com os mecanismos de agregação (DLCA e RLCA). Complementarmente, busca-se compreender como cada método (APE e AMP), e, conseqüentemente, como os agregados formados, influenciam na reprodutibilidade do sinal SERS em relação a detecção e quantificação de contaminantes.

3. Procedimento experimental

3.1. Preparação das amostras de tiabendazol (TBZ)

O pesticida TBZ e o solvente etanol possuem alto grau de pureza ($\geq 99\%$) e foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O TBZ apresenta solubilidade em água de $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L (a 25°C) e em etanol de $1,3 \times 10^{-1}$ mol/L (a 25°C), com ponto de fusão próximo a $298\text{-}304^\circ\text{C}$ [15,16]. As soluções aquosas foram preparadas utilizando água Milli-Q ultrapura ($\text{pH}=5,6$ e resistividade $18,2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25°C). A Figura 1 mostra a estrutura química do TBZ.

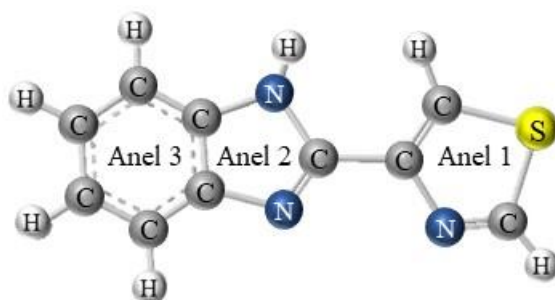


Figura 1: Estrutura química do TBZ. Fonte: autoria própria.

Devido à baixa solubilidade do TBZ em água, as soluções do pesticida foram preparadas a partir de uma solução estoque de TBZ dissolvido em etanol (concentração 10^{-2} mol/L) para posteriores diluições em meio aquoso, de acordo com a Figura 2.

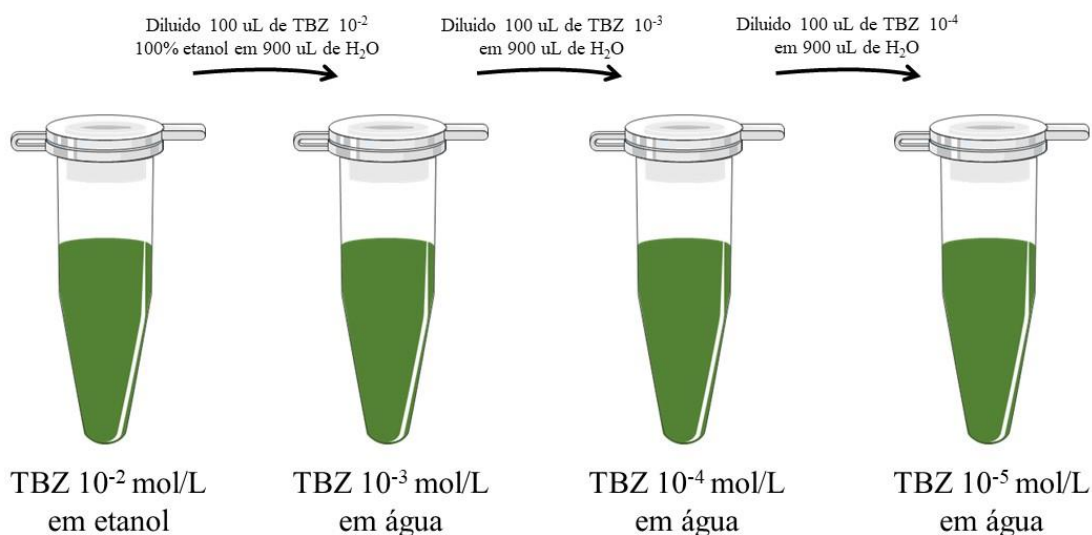


Figura 2: Preparo das diluições do TBZ em diversas concentrações (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} mol/L). Na solução 10^{-2} mol/L o TBZ é dissolvido em etanol. Em 10^{-3} mol/L a solução possui

10% de etanol em água, em 10^{-4} mol/L possui 1% de etanol e em 10^{-5} mol/L possui 0,1% de etanol. Estas soluções com TBZ ainda serão diluídas em coloide de Ag.

3.2. Síntese do coloide de Ag por redução de hidroxilamina hidroclorada

Os reagentes utilizados na síntese do coloide de Ag também foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich: nitrato de prata (AgNO_3 , MM = 169,88 g/mol), hidróxido de sódio (NaOH , MM = 40,00 g/mol) e hidroxilamina hidroclorada ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, MM = 69,49 g/mol).

O coloide de Ag foi sintetizado com base nos procedimentos descritos por Leopold e Lendl [17]. Inicialmente, 300 μL de solução de NaOH (1,0 mol/L) foram adicionados a 90 mL de solução de hidroxilamina ($1,6 \times 10^{-3}$ mol/L) sob agitação magnética e aguardado 5 minutos para homogeneização da solução. Em seguida, um volume de 10 mL de solução de AgNO_3 ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) foi cuidadosamente adicionado (gota a gota). O coloide de Ag foi mantido sob agitação magnética por 10 minutos e, em seguida, mantido à temperatura ambiente e na ausência de luz por 24 horas antes do início dos experimentos. Vale ressaltar que este trabalho envolve a utilização de três sínteses coloidais distintas, que serão referidas como coloide de Ag S1, abrangendo o período das medidas de qualificação (março de 2021 a setembro de 2022); coloide de Ag S2 (outubro de 2022 a abril de 2023), abrangendo as medidas realizadas durante o BEPE do mestrando; e coloide de Ag S3, abrangendo o período subsequente ao BEPE (abril de 2023 a agosto de 2023). Destaca-se que apenas as medidas de DLS e potencial zeta foram realizadas em suspensões coloidais diferentes (coloide S1 e coloide S3). Nas demais medidas, como SERS, UV-Vis e imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizou-se o coloide S2.

3.3. Método de preparo da adição múltipla de padrão (AMP) e adição padrão externo (APE)

O método de adição múltipla de padrão (AMP), exemplificado na Figura 3, consiste basicamente na adição de várias alíquotas da solução de TBZ (molécula-alvo) em um volume fixo de coloide de Ag (1 mL), sendo que, para cada adição de TBZ são realizadas as medidas de extinção no UV-Vis, DLS, potencial zeta e SERS.

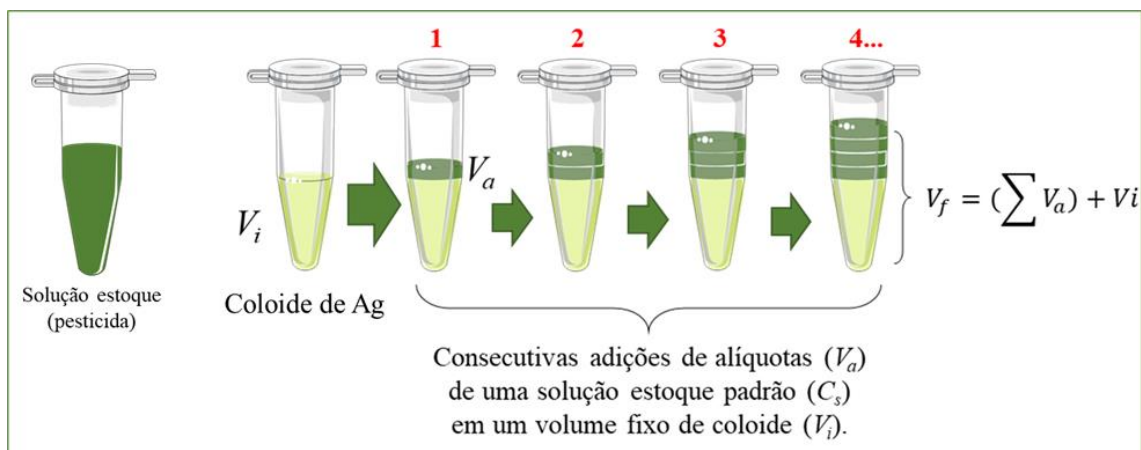


Figura 3: Esquema do método de adição AMP.

No método adição padrão externo (APE) para cada medida realizada, uma alíquota de TBZ é adicionada a uma nova alíquota de coloide de Ag. A Figura 4 mostra como é realizado o método APE. O quadro em destaque (vermelho) é relacionado às concentrações finais de TBZ. As medidas de extinção no UV-Vis, DLS, potencial zeta e SERS são realizadas após a adição de cada alíquota de TBZ.

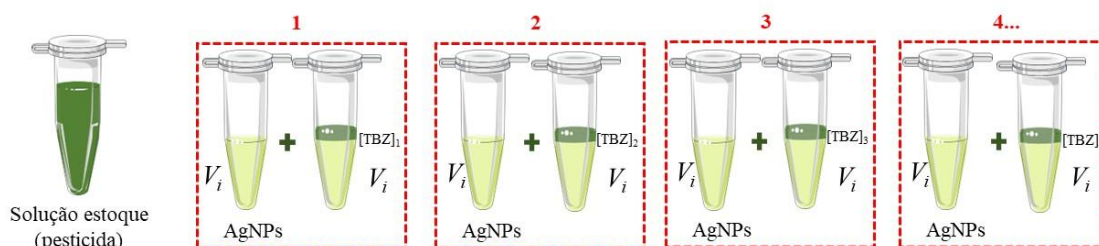


Figura 4: Esquema do método de adição APE.

3.4. Caracterização do coloide de Ag: UV-Vis, DLS e potencial zeta

As medidas de absorção e extinção no UV-Vis foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50, na região de 190 a 1100 nm. O tamanho e potencial zeta das AgNPs (DLS e potencial zeta) foram determinados por meio do equipamento ZetaSize Nano ZS90 da Malvern (633 nm diodo laser) a 25° C. O coloide de Ag foi diluído para evitar saturação no sinal, como mostrado no esquema da Figura 5.

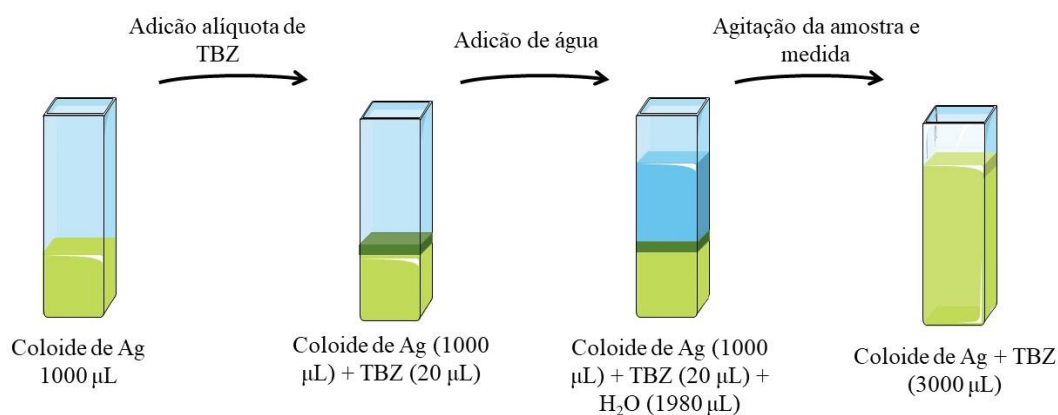


Figura 5: Esquema do preparo da amostra para a realização das medidas de UV-Vis, DLS e potencial zeta. No método APE o coloide de Ag + TBZ é descartado ao final de cada medida e repete-se o processo de preparo da amostra para uma nova aliqüota de TBZ. No método AMP utiliza-se o mesmo coloide de Ag + TBZ para as adições subsequentes de TBZ.

No método AMP foi utilizado um volume fixo de coloide de Ag e adicionadas aliqüotas subsequentes de TBZ. A Figura 5 apresenta as amostras preparadas para as medidas de UV-Vis, e, a

Tabela 2, para as medidas de potencial zeta e DLS (ambas as tabelas se referem ao método AMP). Não foram utilizadas as mesmas amostras do UV-Vis para o potencial zeta e DLS devido ao grande número de amostras que foram obtidas pelo UV-Vis. No método APE, em cada concentração de TBZ preparada e adicionada ao coloide de Ag, a amostra era descartada (coloide de Ag + TBZ). Nas amostras preparadas pelo método APE foi mantido o mesmo padrão utilizado para as medidas SERS, com o volume de coloide de Ag em 1000 µL e 20 µL TBZ e o volume de água adicionado em 1980 µL, com volume final de 3000 µL (coloide de Ag + TBZ). A Tabela 3 mostra os valores de concentrações utilizados no método APE para as medidas de UV-Vis, DLS e potencial zeta. Em ambos os métodos considerou-se apenas a concentração de TBZ diluído no coloide, visto que a água utilizada nos experimentos tem apenas a função de reduzir a turbidez da dispersão.

Tabela 1: Valores referentes às concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas de UV-Vis para o método AMP.

Solução estoque de TBZ (mol/L)	Volume adicionado de TBZ (μL) no coloide de Ag	Volume total de TBZ adicionado no coloide de Ag	Volume total da amostra (coloide de Ag + TBZ) (μL)	Concentração final de TBZ no coloide de Ag (mol/L)
$1,0 \times 10^{-5}$	1	1	1001	$9,9 \times 10^{-9}$
	2	3	1003	$2,9 \times 10^{-8}$
	4	7	1007	$6,9 \times 10^{-8}$
	6	13	1013	$1,2 \times 10^{-7}$
	8	21	1021	$2,0 \times 10^{-7}$
	10	31	1031	$3,0 \times 10^{-7}$
$1,0 \times 10^{-4}$	1	1	1032	$3,9 \times 10^{-7}$
	2	3	1034	$5,9 \times 10^{-7}$
	4	7	1038	$9,7 \times 10^{-7}$
	6	13	1044	$1,5 \times 10^{-6}$
	8	21	1052	$2,3 \times 10^{-6}$
	10	31	1062	$3,2 \times 10^{-6}$
$1,0 \times 10^{-3}$	1	1	1063	$4,1 \times 10^{-6}$
	2	3	1065	$6,0 \times 10^{-6}$
	4	7	1069	$9,7 \times 10^{-6}$
	6	13	1075	$1,5 \times 10^{-5}$
	8	21	1083	$2,2 \times 10^{-5}$
	10	31	1093	$3,1 \times 10^{-5}$

Tabela 2: Valores referentes às concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas de DLS e potencial zeta para o método AMP.

Solução Estoque de TBZ (mol/L)	Volume adicionado de TBZ (μL) no coloide de Ag	Volume total de TBZ adicionado no coloide de Ag	Volume total da amostra (coloide de Ag + TBZ) (μL)	Concentração final de TBZ no coloide de Ag (mol/L)
$1,0 \times 10^{-5}$	1	1	2501	$4,0 \times 10^{-9}$
	12	13	2513	$5,2 \times 10^{-8}$
	18	31	2531	$1,2 \times 10^{-7}$
$1,0 \times 10^{-4}$	1	1	2532	$1,6 \times 10^{-7}$
	12	13	2544	$6,3 \times 10^{-7}$
	18	31	2562	$1,3 \times 10^{-6}$
	40	71	2602	$2,8 \times 10^{-6}$
$1,0 \times 10^{-3}$	1	1	2603	$3,2 \times 10^{-6}$
	12	13	2615	$7,6 \times 10^{-6}$
	18	31	2633	$1,4 \times 10^{-5}$
$1,0 \times 10^{-2}$	1	1	2634	$1,7 \times 10^{-5}$
	12	13	2646	$6,3 \times 10^{-5}$
	18	31	2664	$1,3 \times 10^{-4}$

Tabela 3: Valores referentes às concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas de UV-Vis, DLS e potencial zeta para o método APE.

Solução Estoque de TBZ (mol/L)	Volume adicionado de TBZ (μL) no coloide de Ag	Volume total da amostra (coloide de Ag + TBZ) (μL)	Concentração final de TBZ no coloide de Ag (mol/L)
$5,0 \times 10^{-7}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-8}$
$1,5 \times 10^{-6}$	20	1000	$3,0 \times 10^{-8}$
$3,0 \times 10^{-6}$	20	1000	$6,0 \times 10^{-8}$
$4,5 \times 10^{-6}$	20	1000	$9,0 \times 10^{-8}$
$5,0 \times 10^{-6}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-7}$
$1,5 \times 10^{-5}$	20	1000	$3,0 \times 10^{-7}$
$3,0 \times 10^{-5}$	20	1000	$6,0 \times 10^{-7}$
$4,5 \times 10^{-5}$	20	1000	$9,0 \times 10^{-7}$
$5,0 \times 10^{-5}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-6}$
$1,5 \times 10^{-4}$	20	1000	$3,0 \times 10^{-6}$
$3,0 \times 10^{-4}$	20	1000	$6,0 \times 10^{-6}$
$4,5 \times 10^{-4}$	20	1000	$9,0 \times 10^{-6}$
$5,0 \times 10^{-4}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-5}$
$1,5 \times 10^{-3}$	20	1000	$3,0 \times 10^{-5}$
$3,0 \times 10^{-3}$	20	1000	$6,0 \times 10^{-5}$
$4,5 \times 10^{-3}$	20	1000	$9,0 \times 10^{-5}$
$5,0 \times 10^{-3}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-4}$

3.5. Medidas SERS

As medidas Raman e SERS foram realizadas utilizando o espectrógrafo micro-Raman Renishaw, modelo in-Via, equipado com um microscópio óptico Leica com lente objetiva de 20X e utilizado o laser 785 nm, cuja potência máxima incidida nas amostras é da ordem de μ W, com rede de difração de 1200 linhas/mm. No preparo das amostras SERS não foi preciso diluir o coloide de Ag, como realizado para as técnicas anteriores, pois, nas medidas SERS a turbidez da amostra não afeta no resultado (Figura 6). Porém, como tal diluição pode afetar o sinal SERS, em etapa posterior foram realizadas as medidas SERS para o coloide diluído. Os valores das alíquotas de cada método estão dispostas na Tabela 4 para as medidas AMP e na Tabela 5 para as medidas APE.

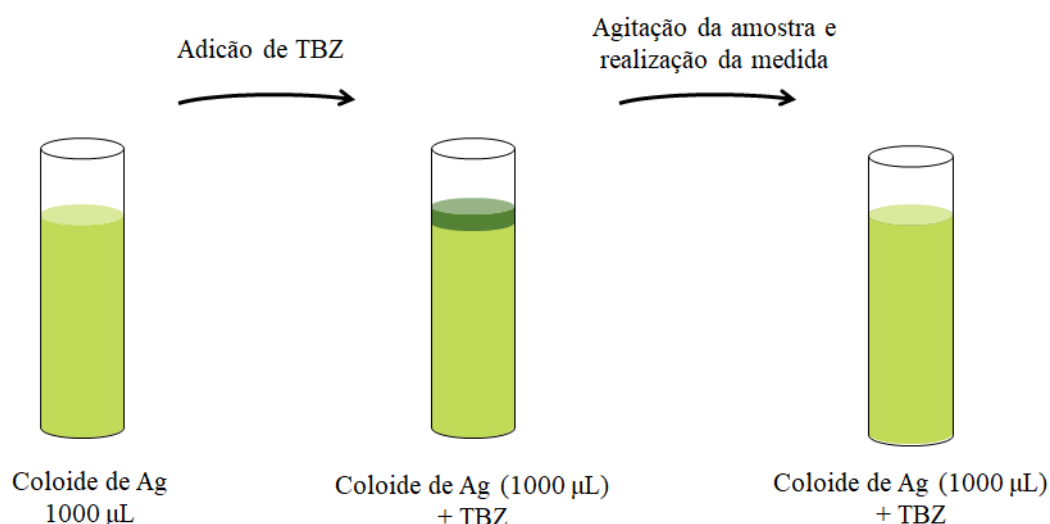


Figura 6: Esquema do preparo da amostra para as medidas SERS. No método APE o coloide de Ag + TBZ é descartado ao final de cada medida e repete-se o processo de preparo da amostra para uma nova alíquota de TBZ. No método AMP utiliza-se o mesmo coloide de Ag + TBZ.

Tabela 4: Valores referentes as concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas SERS do TBZ para o método AMP.

Solução estoque de TBZ (mol/L)	Volume adicionado de TBZ (µL) no coloide de Ag	Volume total de TBZ adicionado no coloide de Ag	Volume total da amostra (coloide de Ag + TBZ) (µL)	Concentração final de TBZ no coloide de Ag (mol/L)
$1,0 \times 10^{-5}$	1	1	1001	$9,9 \times 10^{-9}$
	2	3	1003	$2,9 \times 10^{-8}$
	4	7	1007	$6,9 \times 10^{-8}$
	6	13	1013	$1,2 \times 10^{-7}$
	8	21	1021	$2,0 \times 10^{-7}$
	10	31	1031	$3,0 \times 10^{-7}$
$1,0 \times 10^{-4}$	1	1	1032	$3,9 \times 10^{-7}$
	2	3	1034	$5,9 \times 10^{-7}$
	4	7	1038	$9,7 \times 10^{-7}$
	6	13	1044	$1,5 \times 10^{-6}$
	8	21	1052	$2,3 \times 10^{-6}$
	10	31	1062	$3,2 \times 10^{-6}$
$1,0 \times 10^{-3}$	1	1	1063	$4,1 \times 10^{-6}$
	2	3	1065	$6,0 \times 10^{-6}$
	4	7	1069	$9,7 \times 10^{-6}$
	6	13	1075	$1,5 \times 10^{-5}$
	8	21	1083	$2,2 \times 10^{-5}$
	10	31	1093	$3,1 \times 10^{-5}$

Tabela 5: Valores referentes as concentrações estoques de TBZ e suas respectivas concentrações finais (coloide de Ag + TBZ) utilizadas nas medidas SERS do TBZ para o método APE.

Solução Estoque de TBZ (mol/L)	Volume adicionado de TBZ (μ L) no coloide de Ag	Volume total da amostra (coloide de Ag + TBZ) (μ L)	Concentração final de TBZ no coloide de Ag (mol/L)
$5,0 \times 10^{-7}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-8}$
$1,5 \times 10^{-6}$	20	1000	$3,0 \times 10^{-8}$
$3,0 \times 10^{-6}$	20	1000	$6,0 \times 10^{-8}$
$4,5 \times 10^{-6}$	20	1000	$9,0 \times 10^{-8}$
$5,0 \times 10^{-6}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-7}$
$1,5 \times 10^{-5}$	20	1000	$3,0 \times 10^{-7}$
$3,0 \times 10^{-5}$	20	1000	$6,0 \times 10^{-7}$
$4,5 \times 10^{-5}$	20	1000	$9,0 \times 10^{-7}$
$5,0 \times 10^{-5}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-6}$
$1,5 \times 10^{-4}$	20	1000	$3,0 \times 10^{-6}$
$3,0 \times 10^{-4}$	20	1000	$6,0 \times 10^{-6}$
$4,5 \times 10^{-4}$	20	1000	$9,0 \times 10^{-6}$
$5,0 \times 10^{-4}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-5}$
$1,5 \times 10^{-3}$	20	1000	$3,0 \times 10^{-5}$
$3,0 \times 10^{-3}$	20	1000	$6,0 \times 10^{-5}$
$4,5 \times 10^{-3}$	20	1000	$9,0 \times 10^{-5}$
$5,0 \times 10^{-3}$	20	1000	$1,0 \times 10^{-4}$

3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas na Universidad Complutense de Madrid, utilizando o equipamento JEM 1400 Plus, com tensão de aceleração de 40 a 120 kV em intervalos de 33 V. O modo MET apresenta resolução de 0,38 nm entre pontos e 0,2 nm entre linhas, com aumento variando de 50x a 12,105x. A câmera tem uma distância focal de 15 a 350 cm em AS DIFF e de 4 a 80 cm em HD DIFF, e o canhão de elétrons é do tipo termiônico com filamento LaB6. Para a preparação das amostras para as imagens de MET, foi utilizado o Filme de Carbono sobre 200 mesh, Cobre, adquirido da PELCO Pinpointer Grid. Assim, 5 μ L de suspensão coloidal foram adicionados à grade e aguardados 15 minutos, retirando-se o excesso remanescente de suspensão coloidal, como mostra a Figura 7. As imagens foram obtidas 12 horas após o preparo da

amostra. Para observar os tipos de agregados formados em cada método (APE e SAM), foram preparadas concentrações de acordo com o método de adição proposto.

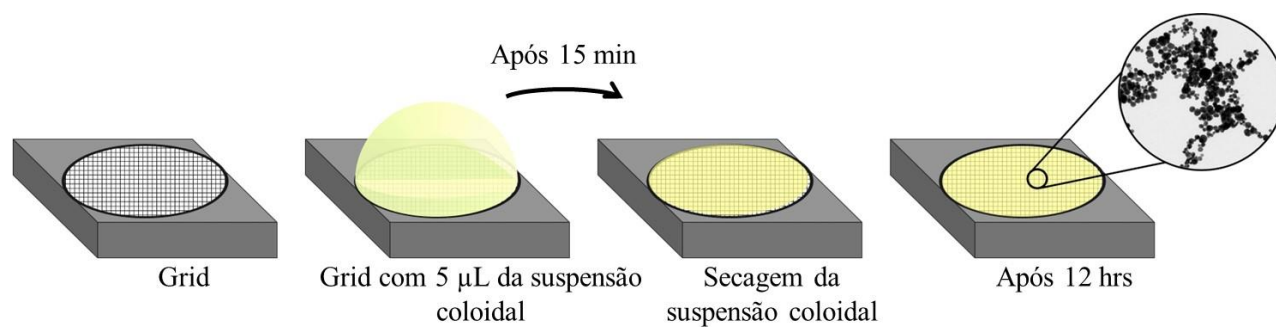


Figura 7: Representação da forma como as amostras foram preparadas para obtenção das imagens de MET.

4. Resultados e discussões

4.1. Mecanismo de adsorção do TBZ sobre as AgNPs (métodos APE e AMP)

Inicialmente foram obtidos espectros SERS do coloide de Ag e coloide de Ag + 20 μL de etanol (máximo de etanol que adicionamos ao coloide de Ag), e espectros Raman do etanol e do TBZ em água (10^{-4} mol/L com 1% de etanol porque a solução estoque de TBZ em 10^{-2} mol/L é em etanol), conforme mostra a Figura 8.

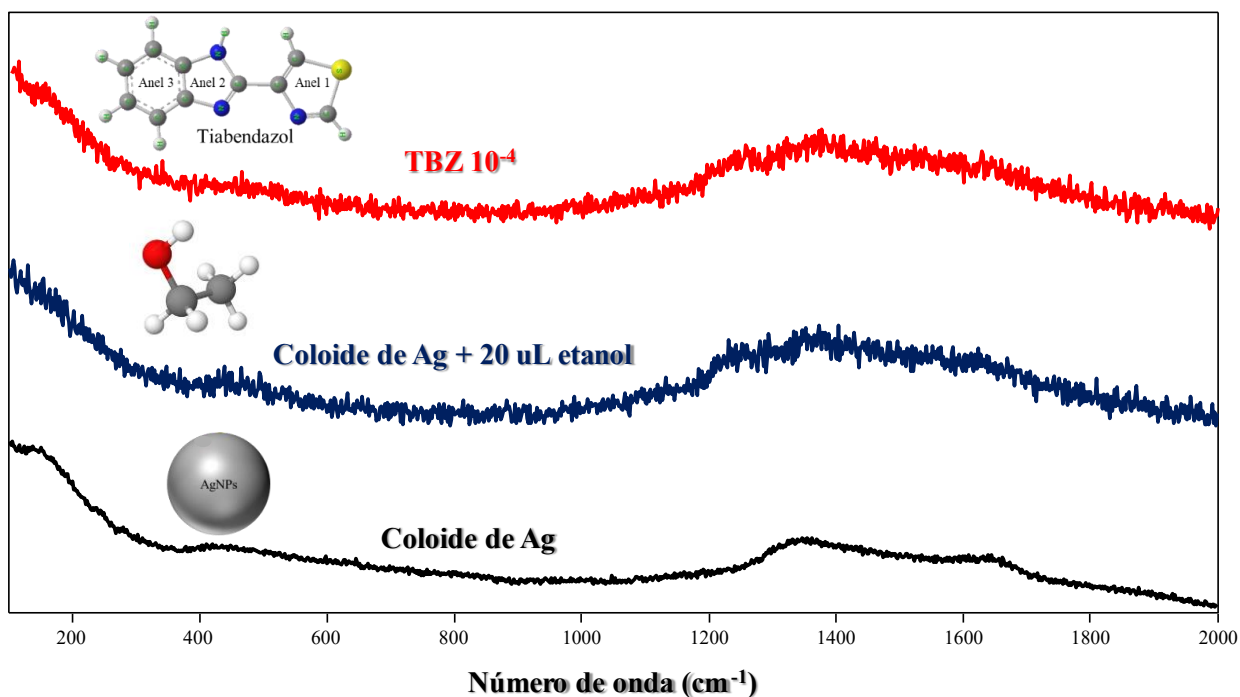


Figura 8: Espectros SERS do coloide de Ag na presença e ausência de 20 μL de etanol e espectro Raman do TBZ em água e etanol (10^{-4} mol/L). Laser: 785 nm. Espectros nas mesmas condições experimentais, com correção de linha de base, colocados no zero de intensidade (*offset correction*) e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”). **Coloide S2.**

Os espectros Raman do coloide de Ag e da solução de TBZ (10^{-4} mol/L) apresentam uma banda larga próximo a 1400 cm^{-1} , referente a interação do laser com a água [18]. A ausência de bandas no coloide de Ag indica que não possui impurezas no nível da medida realizada. Além disso, o espectro da solução de TBZ não apresentou nenhuma banda, indicando que a técnica Raman não é sensível suficiente para realizar a detecção do TBZ mesmo na concentração de 10^{-4} mol/L em meio aquoso.

A partir dos espectros Raman e SERS dos “brancos”, os espectros SERS e Raman do TBZ foram obtidos para compará-los entre si com o intuito de estudar como a molécula de TBZ adsorve na superfície das AgNPs (mecanismo de adsorção). A Figura 9 apresenta os espectros Raman do TBZ em pó e os espectros SERS do TBZ para $1,2 \times 10^{-6}$ mol/L (método AMP) e para $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L (método APE). A Tabela 6 mostra as atribuições relacionadas aos espectros Raman do pó e SERS do TBZ, as quais são oriundas do trabalho de Müller *et al.*[19], no qual os autores fizeram uma descrição bastante completa dos modos vibracionais do TBZ associando cálculo teórico (DFT) e resultados experimentais. Nas nossas análises utilizaremos a atribuição do modo vibracional que mais contribui para a vibração entre as vibrações atribuídas, considerando também outros autores (mencionados ao longo da discussão).

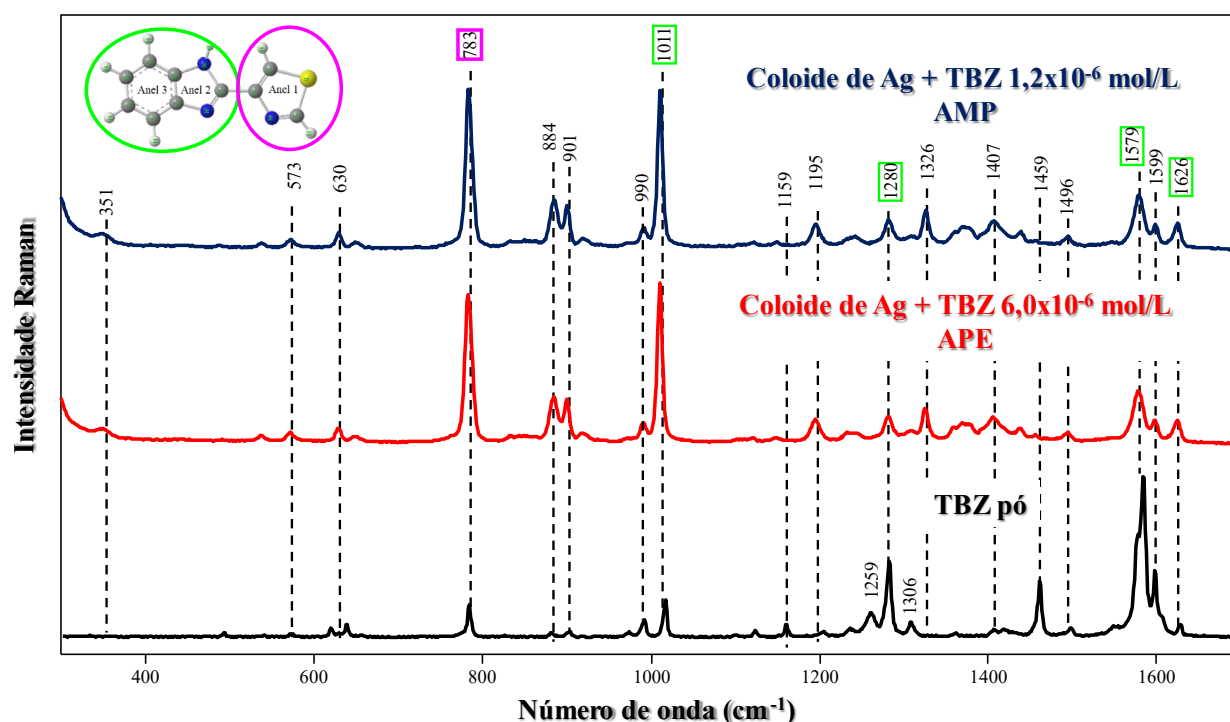


Figura 9: Espectros Raman do TBZ em pó (em preto), espectro SERS do TBZ $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L pelo método APE (em vermelho) e espectro SERS do TBZ $1,2 \times 10^{-6}$ mol/L pelo método AMP (azul escuro). Todos os espectros foram obtidos com o laser 785 nm. Os números de onda destacados em cores diferentes guardam correlação destas cores com os grupos químicos da molécula de TBZ em destaque (*inset*: verde = grupo benzimidazol e rosa = grupo tiazol). Espectros com correção de linha de base e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”). **Coloide S2.**

Tabela 6: Atribuições vibracionais do espectro Raman do pó do TBZ e espectro SERS do TBZ em coloide de Ag.

TBZ sólido (cm ⁻¹)	TBZ SERS (cm ⁻¹)	*Atribuições
571	573	Deformação angular (C–S–C) anel 1 + deformação angular (C–C–C) anel 1 + deformação angular (C–C–C) anel 2 + deformação angular (C–H) anel 2
635	630	Deformação angular (C–S–C) anel 1 + deformação angular (C–H) anel 1 + deformação angular (C–C) anel 3
782	783	Estiramento (S–C) + deformação angular (C=N) anel 1 + deformação angular (C–N) anel 1 + deformação angular (C–C) anel 3
879	884	Estiramento (S–C) + deformação angular (C=C) anel 1 + deformação angular (N=C) anel 1
988	990	Estiramento (C–S)
1011	1011	Estiramento (C–N) anel 2 + estiramento (C–C) anel 2,3 + deformação angular (N=C–N) anel 2,3 + deformação angular (C–H) anel 1
1159	---	deformação angular (C–H) anel 3
1199	1195	Estiramento (C–C) + deformação angular (C–H) anel 1 + deformação angular (N–H) anel 2 + deformação angular (C–H) anel 1,2
1259	---	Estiramento (C–C) + deformação angular (C–H) anel 2 + estiramento (N–H) anel 2 + estiramento (C–H) anel 3
1279	1280	Estiramento (C–N) anel 2 + estiramento (C–N) anel 2 + deformação angular (C–C–H) anel 2 + deformação angular (C=N–N) anel 2
1306	---	Estiramento (C–C) anel 3 + estiramento (N–C) anel 2,3 + deformação angular (N–H) anel 2 + deformação angular (C=C–H) anel 3
1459	---	Deformação angular (C–H) anel 1,3 + estiramento (C=C) + estiramento (C–C) anel 3 + estiramento (N=C)
1577	1579	Estiramento (C–C) anel 2 + estiramento (N=C) anel 2 + estiramento (C=C) anel 3 + estiramento (C–C) anel 3 + deformação angular (C–H) anel 2 + deformação angular (C–N–H) anel 2
1623	1626	Estiramento (C=C) + estiramento (C–C) anel 2,3 + estiramento (N=C) anel 2 + deformação angular (C–H) anel 3 + deformação angular (N–C) anel 2

A Figura 9 mostra os espectros Raman e SERS do TBZ pelos métodos AMP e APE, com ênfase nas bandas que coincidem em número de onda (interligados com linhas pontilhadas). No espectro Raman do pó do TBZ, a banda em 1579 cm⁻¹ possui maior intensidade relativa, sendo referente ao estiramento C-C do grupo benzimidazol [20]

(circulado em verde na Figura 9), além das bandas em 1280 e 1459 cm^{-1} referentes ao estiramento C-C (grupo benzimidazol) [21] e deformação angular C-H (grupo tiazol) [20], respectivamente. As bandas em 783, 1280 e 1459 cm^{-1} apresentam 20%, 47% e 35 %, respectivamente, de intensidade relativa em comparação com a banda mais intensa (1577 cm^{-1} = 100%), sendo a banda em 783 cm^{-1} atribuída ao estiramento S-C [22], comum neste tipo de composto [23].

Como os resultados SERS para ambos os métodos APE e AMP não apresentaram alteração espectral (nem em número de onda, nem em intensidade relativa), podemos inferir que o mecanismo de adsorção para ambos os métodos é o mesmo. Portanto, trataremos ambos os espectros, independentemente do método, da mesma forma nesta seção. O espectro SERS do TBZ é caracterizado pelas bandas em 573, 783, 884, 1011, 1579 e 1626 cm^{-1} , entre outros. A banda em 783 cm^{-1} , atribuída ao estiramento S-C do grupo tiazol (destaque em rosa na Figura 9), diferente do observado no espectro do pó, que apresenta a banda com maior intensidade a banda em 1579 cm^{-1} . Com a inversão da banda mais intensa e o aumento das bandas em 572, 783, 884 e 920 cm^{-1} , referentes ao grupo tiazol, indicam a proximidade deste grupo com a superfície das AgNPs. A diminuição da intensidade da banda em 1577 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-C do grupo benzimidazol pode estar relacionada ao afastamento deste grupo da superfície das AgNPs. Segundo as regras de seleção para SERS, que nos auxiliam na determinação do mecanismo de adsorção e da orientação da molécula sobre as nanopartículas metálicas, basicamente à amplificação do sinal Raman (= SERS) se dá quando o momento de dipolo elétrico induzido na molécula pela radiação incidente apresenta ao menos uma componente perpendicular à superfície metálica, além da proximidade entre o grupo químico espalhador da radiação e a nanopartícula metálica [24]. Dessa maneira, o aumento das intensidades relativas das bandas 783 e 884 cm^{-1} indicam a proximidade do grupo tiazol à superfície das AgNPs e pode-se inferir que as moléculas de TBZ estão adsorvidas na superfície das AgNPs por dois possíveis sítios de adsorção, um pelo átomo de S e outro pelo átomo de N, ambos do grupo tiazol.

O mesmo perfil espectral SERS obtido por nós foi observado por Hussain *et al.* [25], em que os autores utilizaram nanopartículas de Au revestidas com Ag na detecção do TBZ e ferbam em amostras de leite. Porém, neste trabalho de Hussain *et al.* [25], o método de adição usado para as medidas foi o APE com o laser de excitação 633 nm. Chen *et al.* [26], observaram o mesmo perfil espectral obtido por nós para o sinal SERS na detecção do TBZ em amostras de frutas, utilizando nanobastões de Au revestidos com Ag. Os autores utilizaram como preparo de amostra o método APE e a obtenção dos espectros SERS foi

através do laser de excitação 785 nm, porém também não mencionam os mecanismos de adsorção do TBZ.

Com o intuito de identificar a interação mais provável, via N ou S, foi realizado um estudo de análise de reatividade local em colaboração com o Prof. Augusto Batagin Neto (UNESP/campus de Itapeva) por meio de cálculos de DFT que estão apresentados na Figura 10. Os resultados provenientes da análise (*Condensed to Atoms Fukui Indices* – CAFI) (em água) são apresentados da seguinte forma: as regiões em vermelho e em azul indicam, respectivamente, sítios reativos e inertes (em relação a nucleófilos (f^+), eletrófilos (f^-) e radicais livres ($1/2 [f^+ + f^-]$). Os cálculos mostram que o centro de maior reatividade do TBZ (em relação à superfície das AgNPs, neste caso) está associado ao átomo de S, sugerindo que a adsorção da molécula seja preferencialmente por esse átomo (via N seria menos provável). Está hipótese é reforçada através dos cálculos complementares para os complexos TBZ-Ag, que mostram que a interação via átomo de S leva a mudanças na estrutura eletrônica e, conseqüentemente, no espectro de absorção óptica do sistema que são compatíveis com os dados experimentais que serão apresentados na próxima seção. Detalhes destes cálculos foram apresentados no artigo publicado pelo nosso grupo intitulado “*Detection of thiabendazole fungicide/parasiticide by SERS: Quantitative analysis and adsorption mechanism*” [27].

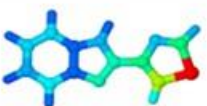
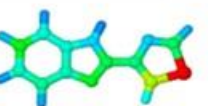
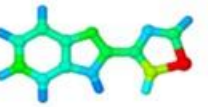
Molécula	Estrutura	f^+	f^-	$1/2 (f^+ + f^-)$
TBZ-CF ₁				
TBZ-CF ₂				

Figura 10: Reatividade local de dois confômeros TBZ (CF1 e CF2) em água: as cores vermelha e azul representam regiões reativas e inertes, respectivamente, em relação a nucleófilos (f^+), eletrófilos (f^-) e radicais livres ($1/2 [f^+ + f^-]$). Cada molécula tem sua própria escala de cores RGB. R: *red*, G: *green* e B: *blue*.

Em relação à orientação da molécula de TBZ na superfície das AgNPs, considerando as regras de seleção para SERS, devido aos modos vibracionais amplificados do TBZ serem principalmente compostos por estiramento (Tabela 6: Atribuições vibracionais do espectro Raman do pó do TBZ e espectro SERS do TBZ em coloide de Ag.), é possível inferir que a molécula esteja adsorvida preferencialmente perpendicular à superfície das AgNPs. O

aumento de intensidade relativa das bandas atribuídos ao grupo tiazol (572 , 782 e 884 cm^{-1}) somado à presença da banda em 884 cm^{-1} , ausente no espectro Raman do pó, atribuída ao estiramento C-S [28] que surgiu no espectro SERS, corroboram a suposição de que a molécula de TBZ esteja adsorvida preferencialmente perpendicular à superfície das AgNPs.

A adsorção do TBZ em superfície metálica foi reportada por Kim *et al.* [21], para os fungicidas benzimidazol e TBZ. Os autores realizaram estudos por meio da técnica SERS utilizando como substrato um espelho de Ag, além da alteração do pH, para laser em 780 nm . Apesar dos autores não mencionarem o método de adição utilizado, pode-se inferir, a partir das medidas, que tratou-se do método APE. Mesmo utilizando um substrato de espelho de Ag, os autores reportaram o mesmo perfil espectral do TBZ obtido por nós para o sinal SERS. As mudanças espectrais observadas foram o aumento da intensidade relativa em 786 , 891 e 1010 cm^{-1} , que são atribuídas ao *wagging* C-H, deformação angular fora do plano C-C-S e *wagging* C-H, respectivamente, além da baixa intensidade relativa das bandas na região entre 1200 e 1500 cm^{-1} atribuídos aos modos de estiramento C=C e C=N (em comparação com o pó). A partir dessas mudanças, os autores deduziram que o TBZ poderia estar adsorvido paralelamente à superfície metálica em pH 7. Enquanto, para o TBZ em pH 2 os autores deduziram que a molécula de TBZ estaria adsorvida perpendicularmente, levemente inclinada à superfície da Ag, através da interação dos átomos de S e N com a Ag. A orientação paralela do TBZ está ainda associada ao aumento da intensidade das bandas 987 e 1631 cm^{-1} atribuídos ao estiramento C-S e estiramento C-N, respectivamente, além de apontarem que a presença da banda em 3086 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-H corrobora com tal adsorção para o TBZ em solução ácida.

De acordo com a literatura, o TBZ em pH 2 apresenta todos os N da sua estrutura protonados e no pH 7 apresenta dois N desprotonados: o N do anel 1 (grupo tiazol) e o N do grupo benzimidazol (essas mudanças ocorrem devido a molécula de TBZ apresentar três pK_a : 2,5, 4,7 e 12) [29]. A Figura 11 ilustra como em diferentes pHs altera-se a estrutura molecular do TBZ.

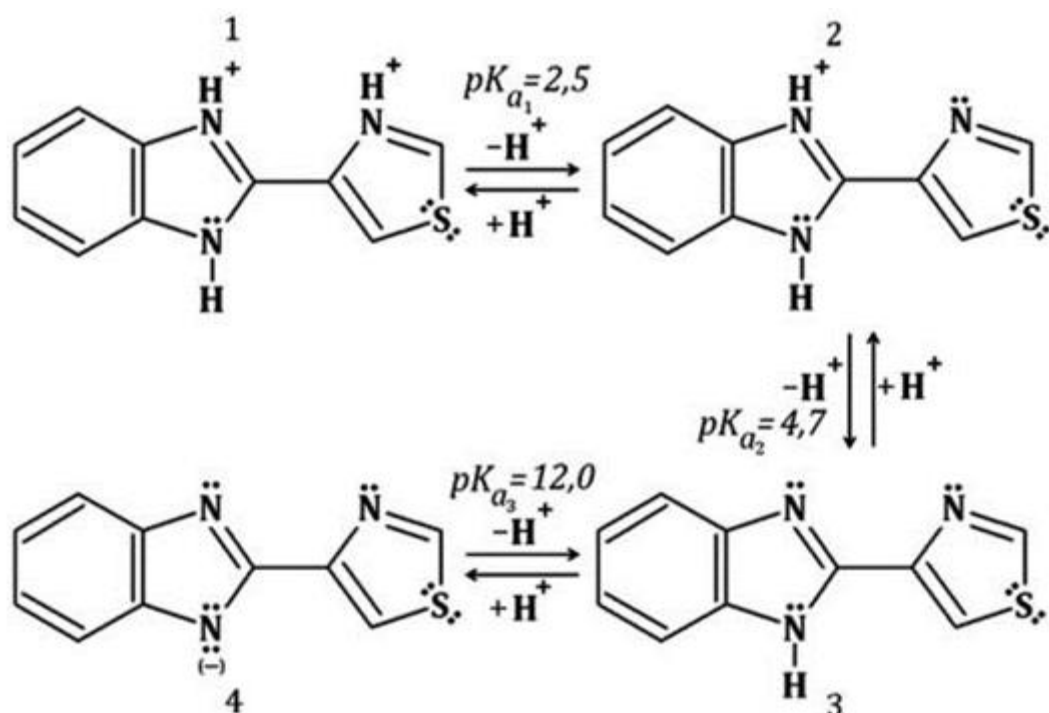


Figura 11: Estrutura molecular do TBZ em diferentes pHs. Adaptado de M. Jalil *et al* [29].

No trabalho de Muller *et al.* [19], os autores realizaram a detecção de TBZ em frutas cítricas e banana utilizando coloide de Ag reduzido com citrato. Neste trabalho os autores também apontam para dois mecanismos possíveis de adsorção do TBZ na superfície das AgNPs, com a molécula de TBZ paralela ou perpendicular à superfície das AgNPs. Os autores associam o TBZ estar adsorvido em paralelo ao alargamento e deslocamento de algumas bandas do espectro SERS (coloide de Ag/citrato) em relação as mesmas bandas no espectro Raman (solução aquosa), principalmente as bandas em 1006 e 1574 cm^{-1} . Porém, essas mudanças citadas pelos autores não são observadas em nossos resultados, o que, de certa forma, é consistente com o fato de que em nosso sistema (coloide de Ag/hidroxilamina) o TBZ não deva estar paralelo a superfície.

4.2. Análise quantitativa

4.2.1. Medidas SERS em diferentes concentrações utilizando o método APE

A Figura 12 mostra os espectros SERS/APE do TBZ em todas as concentrações ($9,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) testadas.

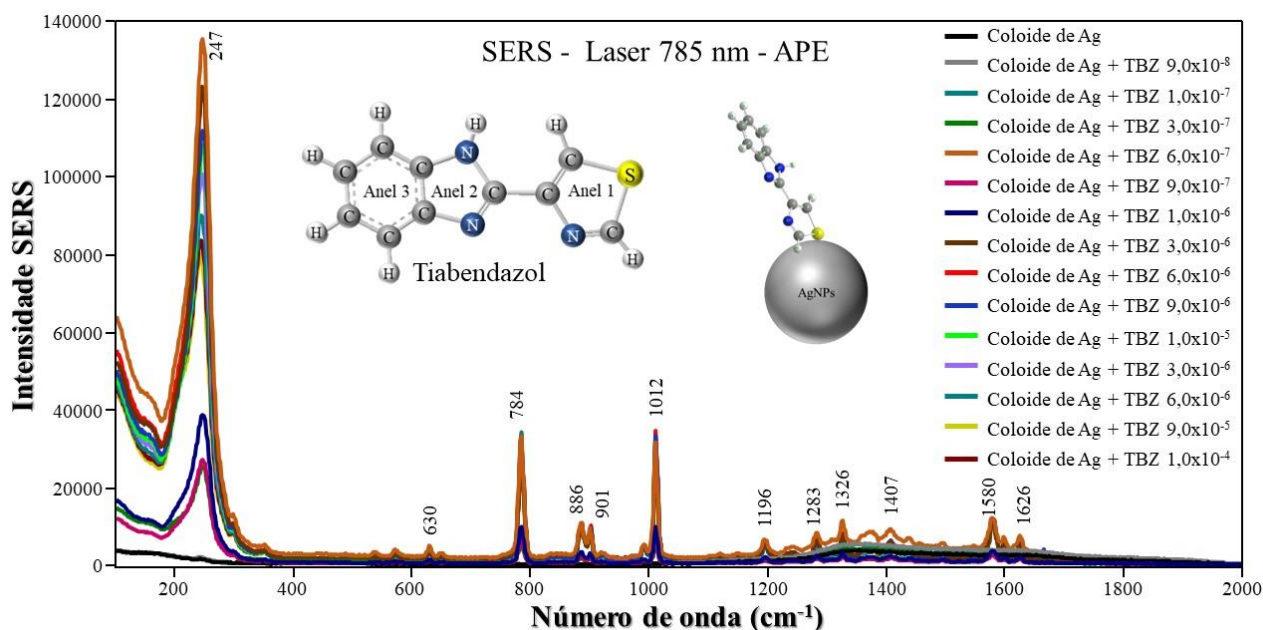


Figura 12: Espectros SERS/APE do TBZ nas concentrações de $9,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Os espectros foram obtidos com 10% de intensidade do laser até a concentração de $6,0 \times 10^{-7}$ mol/L, a partir da concentração de $9,0 \times 10^{-7}$ mol/L foram obtidos com 1% de intensidade devido à saturação do sinal SERS. Espectros com correção de linha de base e colocados no 0 eixo y (*offset correction*). Laser 785 nm. Coloide S2.

Nos espectros SERS/APE da Figura 5 é possível observar as bandas características do TBZ, em geral, podemos observar que, com o aumento da concentração de TBZ o sinal SERS também aumenta, devido ao número de moléculas adsorvidas na superfície das AgNPs. Com o intuito de encontrar os limites de detecção para este método separamos os espectros que apresentam as menores concentrações. A Figura 13 mostra os espectros SERS/APE do TBZ nas concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

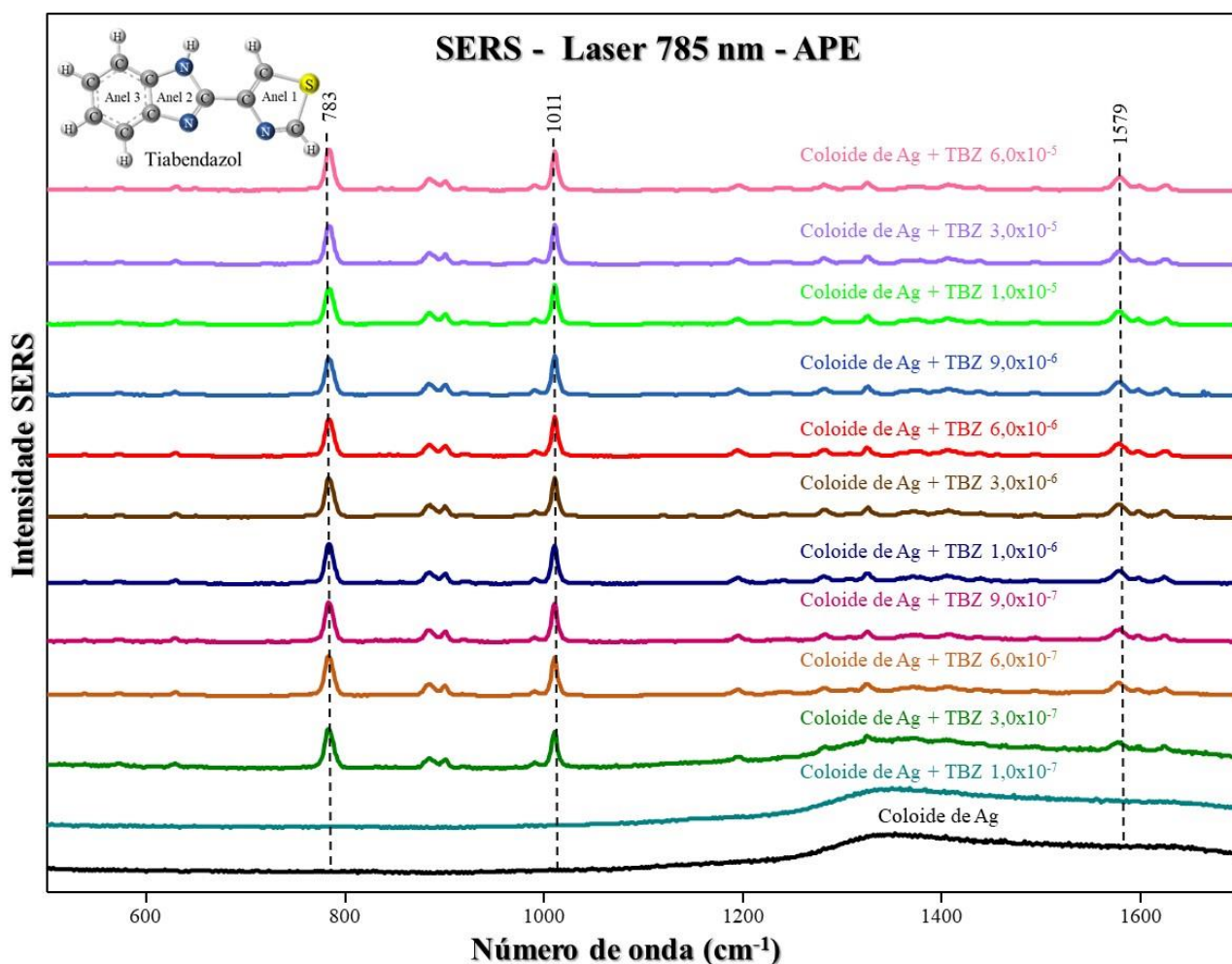


Figura 13: Espectros SERS/APE do coloide de Ag e do TBZ nas concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Espectros com correção de linha de base e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”). Laser 785 nm.

Na Figura 13 é possível observar as bandas características do TBZ até baixas concentrações, $3,0 \times 10^{-7}$ mol/L, porém com baixa intensidade SERS. As bandas mais intensas que indicam a presença do TBZ são 783 e 1011 cm^{-1} referentes às vibrações S-C e C-H, respectivamente [25,30]. No livro “*Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*”, o autor Richard L. McCreery [31], considera um sinal Raman detectável quando a razão entre a intensidade da banda pela intensidade do ruído para o mesmo número de onda é maior ou igual a 3. Na concentração de $3,0 \times 10^{-7}$ mol/L o valor da razão é de 15,1 para a banda 1011 cm^{-1} , por exemplo. Porém, para a concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L já não foram mais observadas as bandas SERS características do TBZ. De acordo com Desimoni & Brunetti [32], o limite de detecção (LOD) pode ser definido pela relação sinal/ruído igual a 3 na medida em que permite comprovar a presença do analito na amostra por meio da(s) sua(s) banda(s) caracterísitcas. No nosso caso, considerando uma variação linear da intensidade do

sinal SERS em baixas concentrações, o sinal mais baixo do TBZ estimado é de $5,9 \times 10^{-8}$ mol/L nas condições experimentais aqui utilizadas (laser 785 nm, potência 10%, lente 50x-longa, 1 acumulação, tempo de integração 10 segundos).

A fim de observarmos o comportamento da intensidade SERS em relação a concentração de TBZ, a Figura 14 mostra a isoterma de adsorção para os valores da intensidade da banda em 1011 cm^{-1} vs a concentração de TBZ ($6,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) com todos os espectros mostrados na Figura 12. Observa-se que com o aumento da concentração de TBZ ocorre o aumento da intensidade SERS até atingir o máximo em $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L. Após essa concentração não há aumento na intensidade SERS.

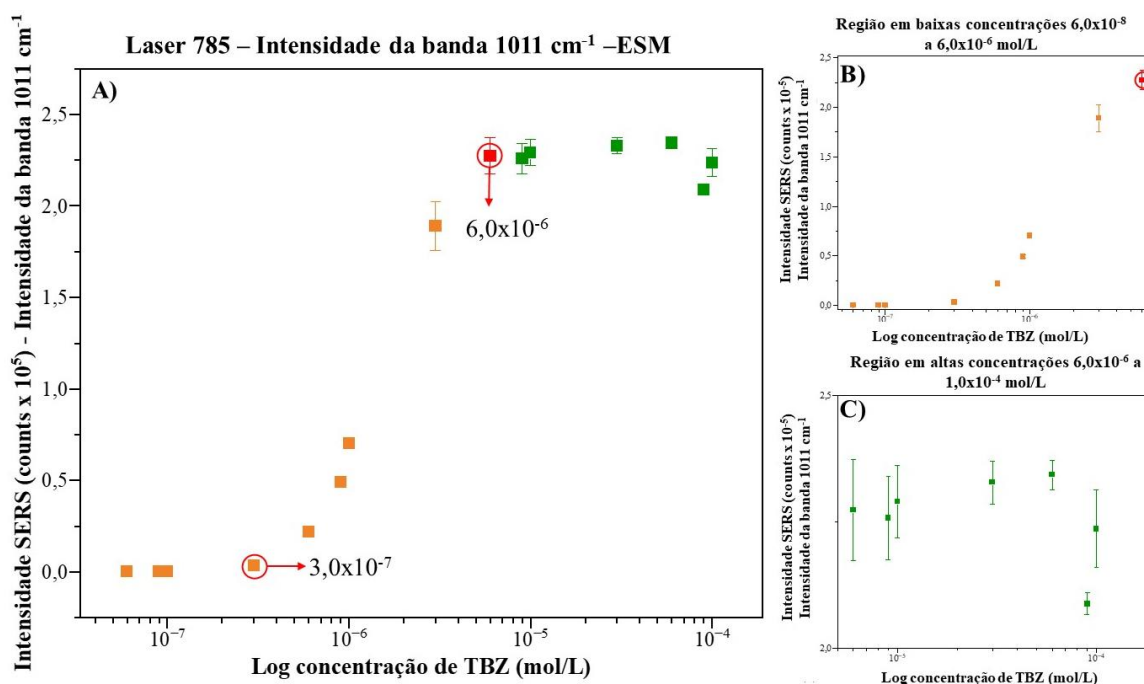


Figura 14: Intensidade SERS dada pelos valores da intensidade da banda em 1011 cm^{-1} vs log da concentração de TBZ em **A)** todas as concentrações de $6,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L, com a primeira concentração que apresenta espectro do TBZ ($3,0 \times 10^{-7}$ mol/L) e com sinal mais intenso ($6,0 \times 10^{-6}$ mol/L) circulas em vermelho. **B)** Região em baixas concentrações $6,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L e **C)** altas concentrações de $3,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L pelo método APE.

Como a intensidade SERS é proporcional ao número de moléculas adsorvidas na superfície da nanopartícula, a Figura 14A, pode ser considerada uma isoterma de adsorção de moléculas de TBZ na superfície das AgNPs [33]. O comportamento sigmoide observado na Figura 14A (método APE) pode ser interpretado via “modelo B.D.D.T”, nomeado dessa forma devido às iniciais dos autores do artigo que realizaram o estudo de diferentes isotermas de adsorção, Brunauer, Deming, Deming e Teller [34]. O modelo B.D.D.T aborda 5 tipos de

isotermas de adsorção a partir da relação entre duas constantes, K_{ad} e K_2 . A Figura 15 mostra os 5 tipos de isotermas abordadas por Brunauer *et al.* [34]. A constante K_{ad} é relacionada a adsorção analito-nanopartícula e a constante K_2 às interações intermoleculares do analito (adsorbato) [34]. Portanto, para o sistema TBZ+AgNPs, o "tipo V" indica que a adsorção de TBZ na superfície de Ag apresenta duas constantes de interação e saturação, envolvendo esses dois processos diferentes com $K_{ad} \cong K_2$: um corresponde à formação da primeira camada (K_{ad}), que depende da interação da molécula de TBZ com a superfície de Ag; outro depende da associação das moléculas de TBZ entre si (K_2), que ocorre na segunda e nas subsequentes camadas. A isoterma de adsorção de Langmuir, muito comumente discutida neste contexto de adsorção, é caracterizada somente pela constante K_{ad} , sem a formação de camadas sucessivas que dependem da interação das moléculas de adsorbato entre si (K_2). [35,36]

Interpretação semelhante do mecanismo de adsorção do TBZ sobre a superfície da Ag obtida a partir do modelo B.D.D.T para a curva V pode ser encontrada no trabalho de Giles *et al.* [37]. Ainda em Giles *et al.* [37], alguns detalhes adicionais podem ser obtidos para a primeira região da curva S (baixas concentrações), a qual apresenta um crescimento não linear da intensidade SERS com a concentração de TBZ, sugerindo que a adsorção de um adsorbato é facilitada pela presença de outro adsorbato previamente adsorvido. As relações entre tipos de isoterma e mecanismos de adsorção serão apresentadas com mais detalhe para o modelo AMP a seguir em 4.2.2.

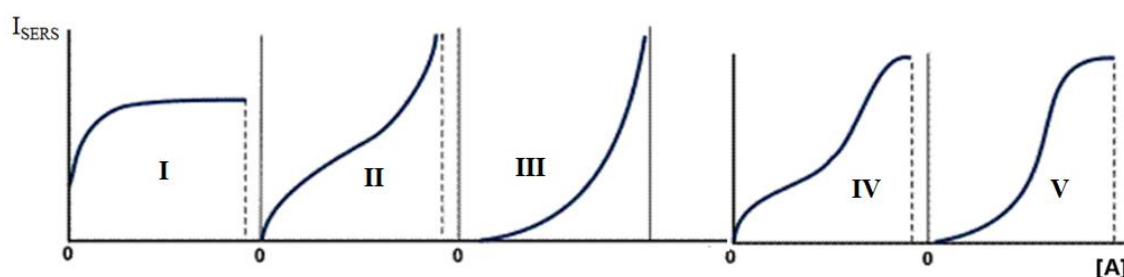


Figura 15: Isotermas de adsorção propostas pelo modelo B.D.D.T, adaptado de Brunauer *et al.* [34].

4.2.2. Medidas SERS em diferentes concentrações utilizando o método AMP

A Figura 16 mostra os espectros SERS do TBZ em todas as concentrações ($9,9 \times 10^{-9}$ a $3,2 \times 10^{-5}$ mol/L) testadas para o método AMP.

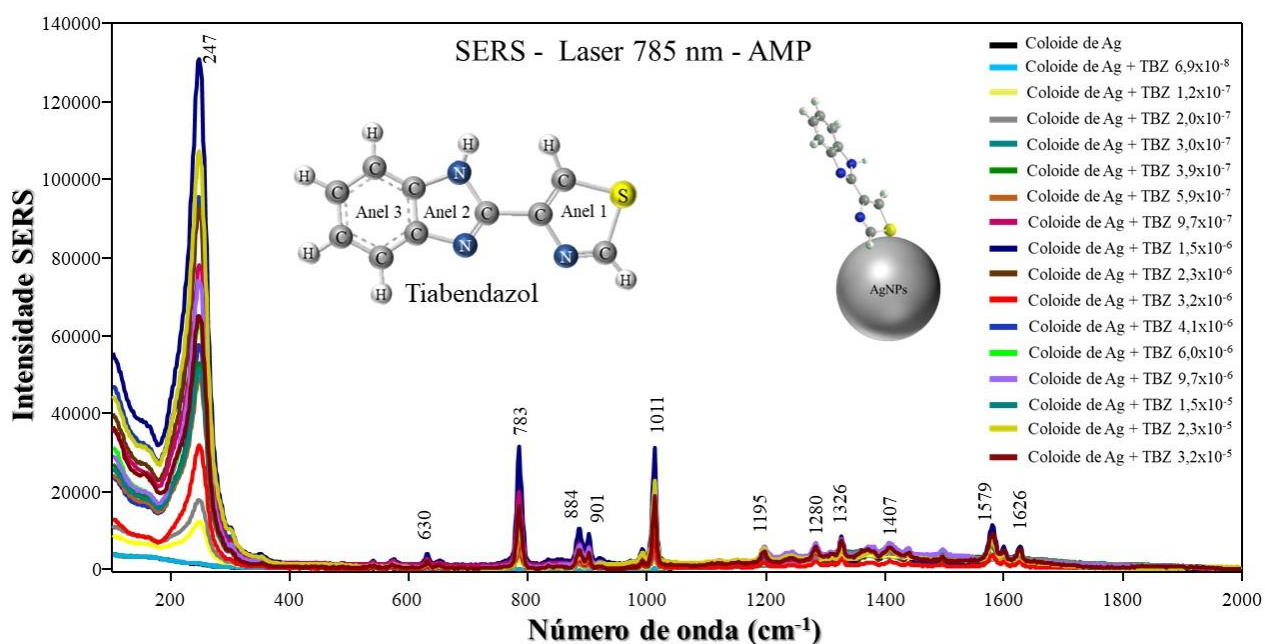


Figura 16: Espectros SERS/AMP do TBZ nas concentrações de $9,9 \times 10^{-9}$ a $3,2 \times 10^{-5}$ mol/L. As concentrações de $9,9 \times 10^{-9}$ a $5,9 \times 10^{-7}$ foram excitadas com 10 % da intensidade do laser. A partir da concentração de $9,7 \times 10^{-7}$ foram excitadas com 1% da intensidade devido a saturação do sinal SERS. Espectros com correção de linha de base e colocados no 0 eixo y (*offset correction*). Laser 785 nm.

Na Figura 16 os espectros SERS apresentam as principais bandas do TBZ, semelhante à Figura 12, e a intensidade SERS também aumenta conforme há o aumento da concentração do TBZ. Com o objetivo de encontrarmos o LOD, a Figura 17 mostra os espectros SERS/AMP do TBZ nas concentrações de $6,9 \times 10^{-8}$ a $2,3 \times 10^{-5}$ mol/L.

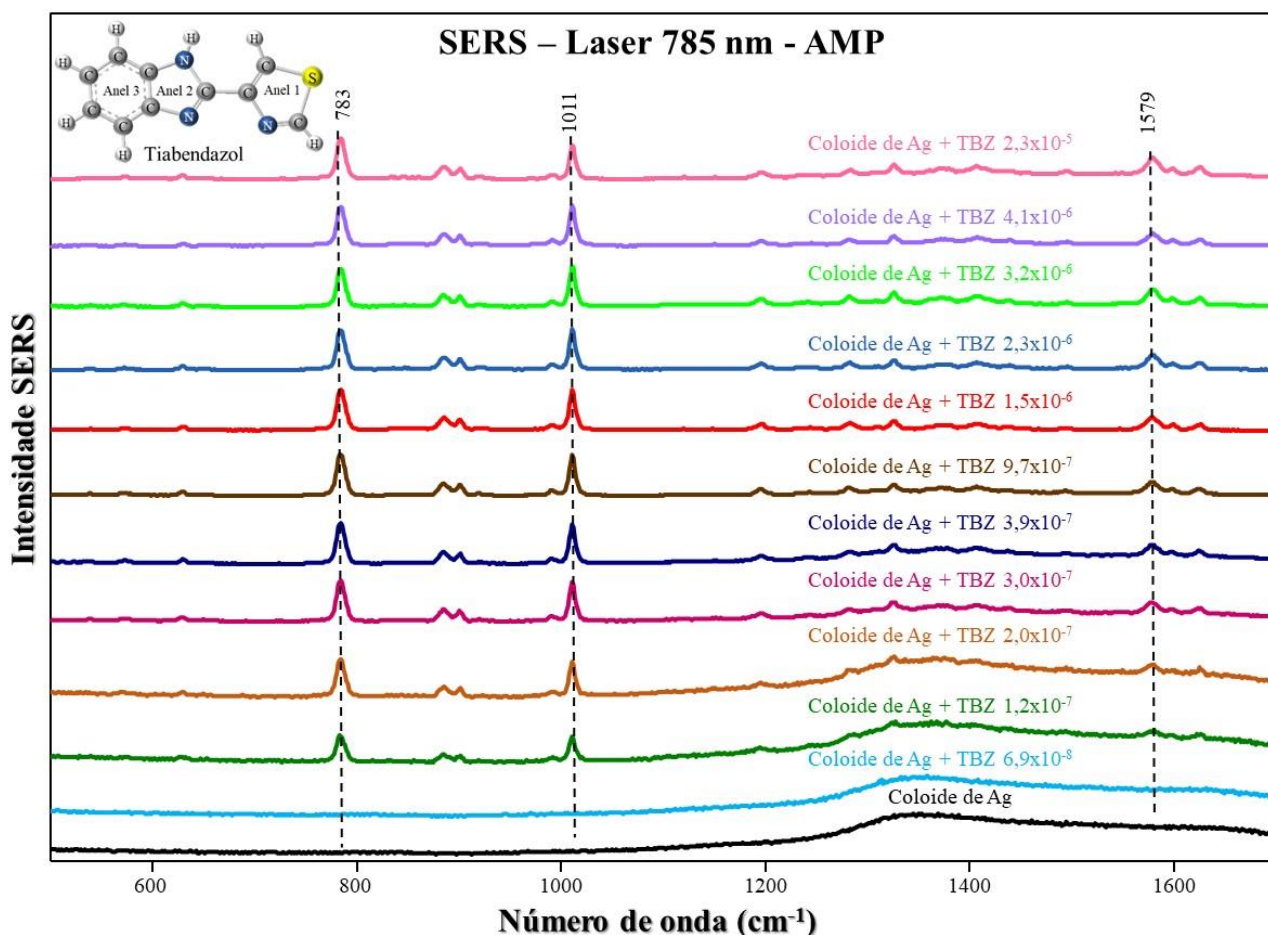


Figura 17: Espectros SERS/AMP do coloide de Ag e do TBZ nas concentrações de $6,9 \times 10^{-8}$ a $2,3 \times 10^{-5}$ mol/L. Espectros com correção de linha de base e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”). Laser 785 nm.

Nas medidas SERS/AMP é possível observar as bandas características do TBZ até baixas concentrações, sendo a concentração que apresenta as primeiras bandas de TBZ a de $1,2 \times 10^{-7}$ mol/L. Nessa concentração o valor da razão de intensidade ruído foi de 7,3 para a banda em 1011 cm^{-1} . As medidas também foram realizadas com 10% de intensidade, laser 785 nm, lente 50x-longa, 1 acumulação e tempo de integração de 10 segundos e fazendo-se os cálculos como no método APE, considerando que a diminuição da intensidade do sinal SERS a baixas concentrações seja linear, a concentração mais baixa a detectar TBZ é de $4,9 \times 10^{-8}$ mol/L (LOD), muito próximo ao estimado para o método APE, que foi de $5,9 \times 10^{-8}$ mol/L.

A Figura 18A mostra a isoterma de adsorção do TBZ para as concentrações de $9,9 \times 10^{-9}$ a $3,2 \times 10^{-5}$ mol/L, com destaque para as regiões em baixas concentrações de $9,9 \times 10^{-9}$ a $9,7 \times 10^{-7}$ mol/L (Figura 18B) e altas concentrações $1,5 \times 10^{-6}$ a $3,1 \times 10^{-5}$ mol/L (Figura 18C).

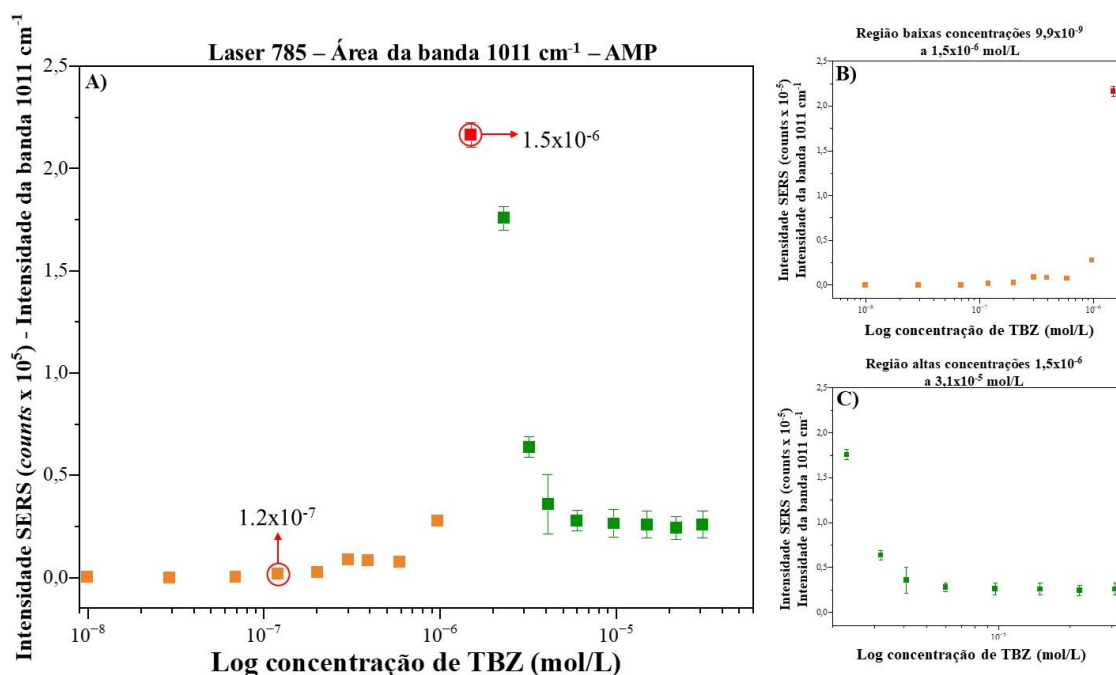


Figura 18: Valores da intensidade da banda em 1011 cm⁻¹ vs log da concentração de TBZ de **A)** todas concentrações de 9,9x10⁻⁹ a 3,2x10⁻⁵ mol/L, com a primeira concentração que apresenta espectro do TBZ (1,2x10⁻⁷ mol/L) e com sinal mais intenso (1,5x10⁻⁶ mol/L) circulas em vermelho. **B)** Região em baixas concentrações 9,9x10⁻⁹ a 9,7x10⁻⁷ mol/L e **C)** altas concentrações de 1,5x10⁻⁶ a 3,1x10⁻⁵ mol/L pelo método AMP.

A curva na Figura 18A não compreende nenhuma curva do “modelo de B.D.D.T.”. Porém, ao dividir as curvas em baixas e altas concentrações, a curva da Figura 18B (baixas concentrações) pode ser associada à curva III no modelo B.D.D.T. ou, complementarmente, à curva S1 relatada por Giles *et al.* [37], cujas isotermas de adsorção por eles estudadas são mostradas na Figura 19, as quais referem-se ao mecanismo de adsorção de adsorbatos diversos em solução sobre superfícies sólidas também diversas.

Giles *et al.* [37] descrevem que, para a obtenção de curvas da família S, o soluto (adsorbato) deve satisfazer, de modo geral, três condições: i) ser monofuncional, ou seja, ter uma localização bem definida espacialmente de interação com o substrato; ii) ter interação intermolecular moderada (permitindo com que a molécula de soluto adsorva perpendicularmente a superfície do substrato); iii) encontrar forte concorrência por sítios do substrato com as moléculas do solvente ou de outra espécie adsorvida. Isto implica que, na parte inicial das curvas S (baixas concentrações de soluto), quanto mais soluto já houver adsorvido, mais fácil é a adsorção de quantidades adicionais, em uma associação “lado a lado” entre as moléculas adsorvidas, ajudando a mantê-las na superfície, o que tem sido chamado de “adsorção cooperativa”. Neste estágio, se a orientação das moléculas se dá de forma que a nova superfície tenha alta atração por mais soluto, a curva sobe continuamente.

Já no estágio final das curvas S (altas concentrações), à medida que mais soluto é adsorvido, geralmente há progressivamente menos chance que uma molécula de soluto na solução encontre um sítio para adsorção no substrato. Neste estágio, se as moléculas de soluto adsorvidas formando uma monocamada estão orientadas de forma que a nova superfície que apresentam para a solução tenha baixa atração por moléculas do soluto, a curva apresenta então um longo platô.

O TBZ ancora às AgNPs através do átomo de S, preferencialmente, e possui uma interação intermolecular moderada (não há indícios de forte interação entre as moléculas de TBZ em solução – perfil dos espectros de UV-Vis não variam com a concentração de TBZ no intervalo aqui considerado $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-5}$). Resultados anteriores de nosso grupo [27], assim como estes aqui apresentados (banda 783 cm^{-1} vibrações S-C), sugerem que a molécula de TBZ adsorve perpendicularmente à superfície das AgNPs, além de apresentar forte atração pela superfície das AgNPs. Portanto, assim como sugerido para o método APE via modelo B.D.D.T (isoterma V), segundo Giles *et al.* [37] (isoterma S1, ou S2 em seu estágio inicial), a curva de adsorção do TBZ mostrada na Figura 18B para as amostras preparadas pelo método AMP (baixas concentrações), a adsorção é caracterizada pela formação inicial de uma camada de TBZ a partir de sua interação com a nanopartícula (adsorção perpendicular, preferencialmente).

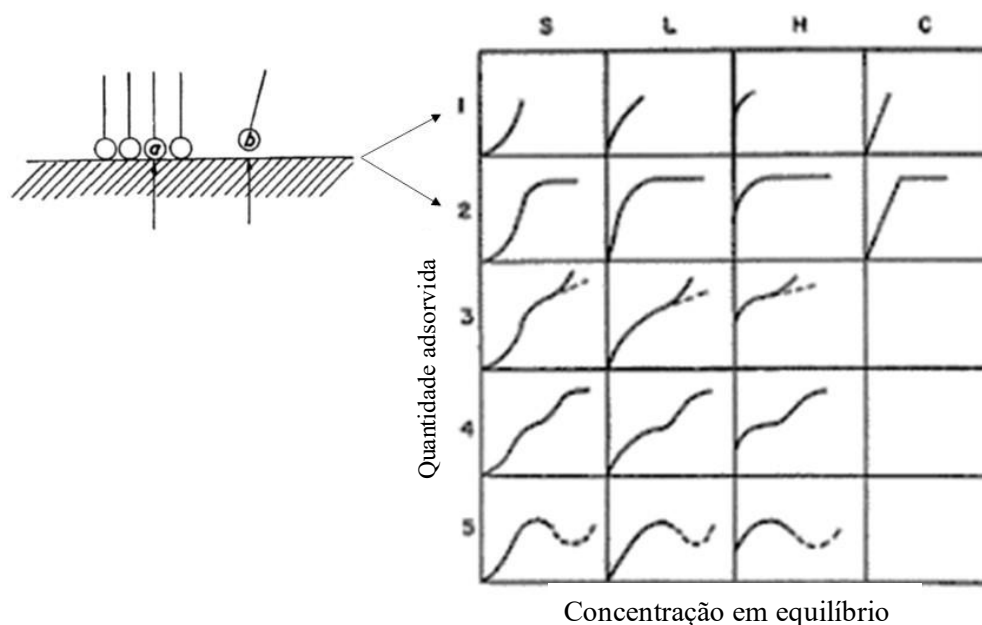


Figura 19: Sistema de classificação de isotérmicas de Giles *et al.* [37]. Detalhe: ilustração esquemática das condições que favorecem a geração das isotermas S e L. Solute polar monofuncional sobre substrato polar em solvente polar. Uma molécula de soluto é mais

estável adsorvida em “a”, adjacente a outras moléculas já adsorvidas, do que isoladamente em “b”. Resultado: isoterma S. Adaptado de Giles *et al.* [37].

Já a queda do sinal SERS observada na Figura 18C não é representada em nenhum dos sistemas estudados até então para explicar tal comportamento. No entanto, no trabalho de Sánchez-Cortés *et al.* [38], os autores realizaram estudos utilizando 1,5dimethylcitosine (DMC) como agente agregador em nanopartículas de Ag e Cu, com intuito de analisar a relação entre morfologia e os resultados SERS. Os autores relataram a queda de intensidade do sinal SERS como a mostrada na Figura 18C e associaram a queda ao tipo de agregado formado, que neste caso seriam compactos.

No nosso caso, uma outra hipótese poderia estar associada à dessorção das moléculas de TBZ na superfície das AgNPs promovida por uma interação TBZ-TBZ maior que a interação TBZ-Ag proporcionada pelo método AMP a partir da concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L de TBZ. Esta hipótese não nos parece razoável e pode ser descartada por completo a partir dos espectros de extinção no UV-Vis discutidos mais adiante (ausência da banda do TBZ em tais espectros). Um excesso de agregação do coloide induzido pelo TBZ via método AMP a ponto de torná-lo inadequado (degradação/precipitação) à amplificação do sinal SERS seria uma hipótese plausível, a qual apresentou-se consistente com os resultados de espectroscopia de extinção no UV-Vis e imagens ópticas discutidas na Seção 4.3.

4.3. Medidas de extinção no UV-Vis em ambos os métodos APE e AMP

Os espectros de extinção do colóide de Ag na presença do TBZ estão apresentados na Figura 20, e contém as concentrações de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L pelo método APE.

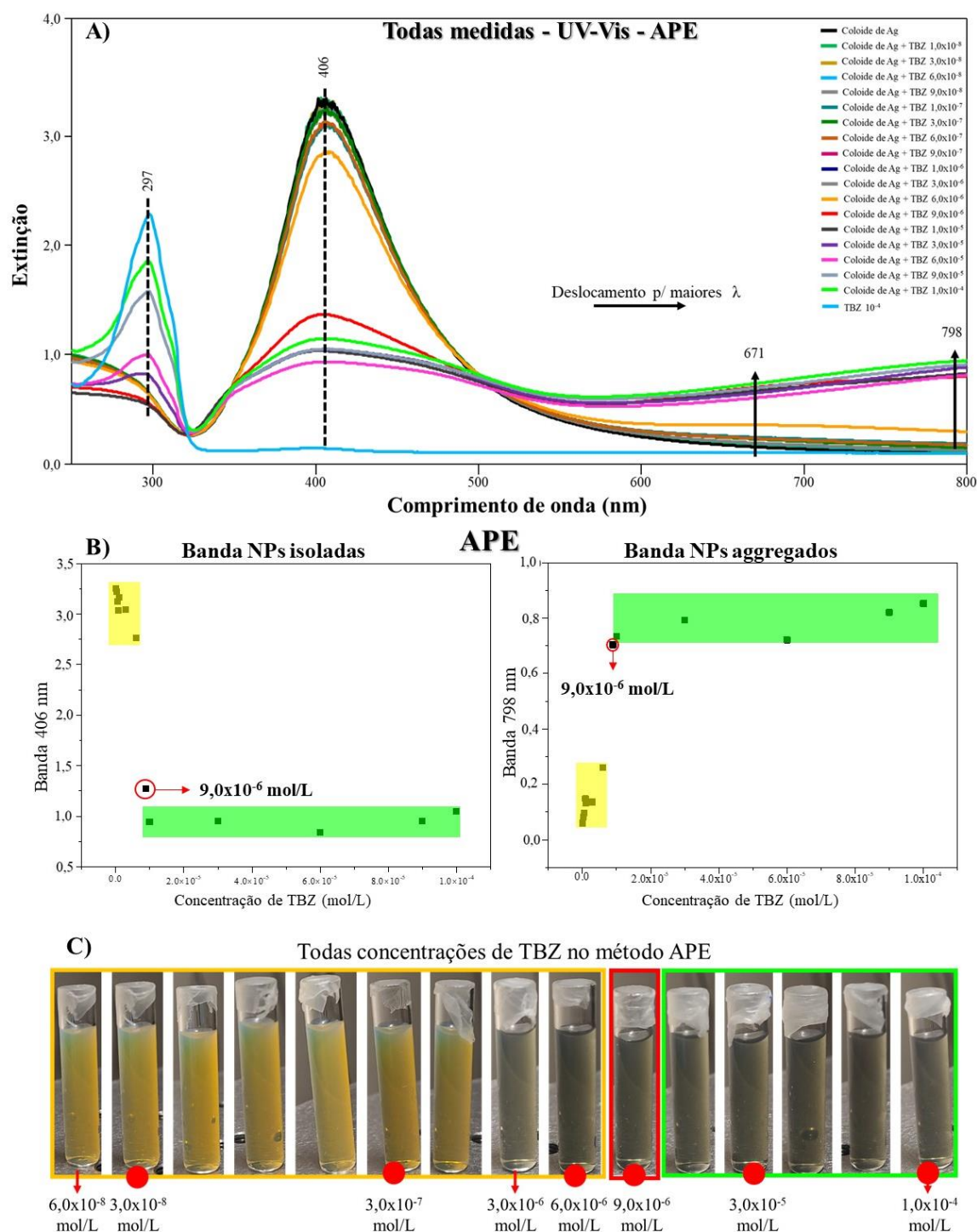


Figura 20: **A)** Espectros de extinção no UV-Vis do colóide de Ag na ausência e presença de TBZ nas concentrações de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L adicionado pelo método APE. Linha de base para amostra com colóide de Ag: cubeta de quartzo com água ultrapura. **B)** Extinção vs concentração de TBZ (mol/L) para as bandas em 405 (AgNPs isoladas) e 798 nm (AgNPs agregadas) para o método APE. **C)** Imagens (a partir de fotos de celular) do colóide de Ag

para diversas concentrações de TBZ do método APE, com as concentrações utilizadas para as imagens TEM marcadas com uma esfera vermelha.

O espectro de extinção do UV-Vis do coloide de Ag apresenta *plasmon* centrado em 406 nm referente às nanopartículas isoladas, sendo valor próximo ao relatado na literatura para coloide de Ag com nanopartículas de morfologia esférica [39]. O espectro da solução de TBZ 10^{-4} mol/L (azul claro na Figura 20A) apresenta apenas um máximo de absorção em 297 nm, atribuído à transição eletrônica $\pi-\pi^*$ do anel aromático [40].

A Figura 20 (método APE) mostra uma diminuição contínua da intensidade do *plasmon* em 406 nm referente às AgNPs isoladas até a concentração de $3,0 \times 10^{-6}$ mol/L. Porém, na concentração de $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L, chamada aqui de concentração crítica por ser a concentração das maiores mudanças espectrais, não só o máximo em 406 nm sofre uma queda ainda mais significativa do que a observada para $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L, como também surge claramente uma banda em maiores comprimentos de onda (> 600 nm). Essas mudanças nos espectros de extinção no UV-Vis indicam a agregação das AgNPs induzida pela presença do TBZ [41].

Em concentrações de TBZ maiores que $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L, as intensidades do *plasmon* em 406 nm e do *plasmon* dos agregados (> 600 nm) variam dentro de uma faixa com o aumento da concentração de TBZ, tendendo a um patamar (estabilização), como mostra a Figura 20B. Isto pode ser consequência de uma excessiva agregação do coloide, como sugere a sua mudança de cor de amarelado até $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L para acinzentado a partir de $3,0 \times 10^{-6}$ mol/L (Figura 20). Por fim, a partir da concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L (inclusive), observa-se o surgimento da banda em 297 nm, que corresponde à absorção do TBZ. Isso indica a presença de TBZ “livre” na dispersão coloidal, sugerindo que o TBZ já não está mais adsorvendo nas AgNPs e seus agregados, ficando como um excesso na dispersão.

A Figura 21 mostra os espectros de UV-Vis nas concentrações de $6,9 \times 10^{-8}$ a $3,2 \times 10^{-5}$ mol/L pelo AMP.

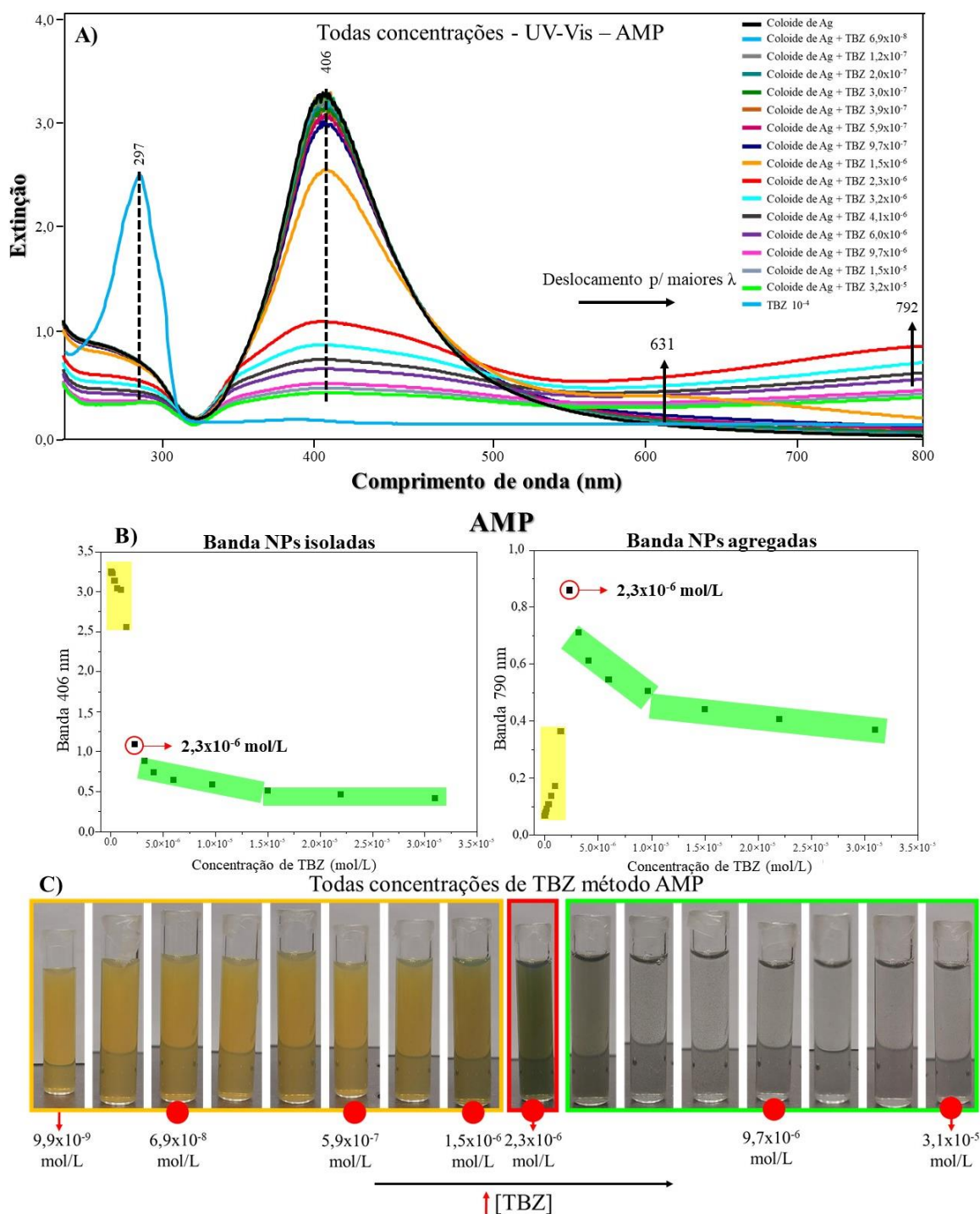


Figura 21: **A)** Espectros de extinção no UV-Vis do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ nas concentrações de $6,9 \times 10^{-8}$ a $3,2 \times 10^{-5}$ mol/L adicionado pelo método AMP. Linha de base para amostra com coloide de Ag: cubeta de quartzo com água ultrapura. **B)** extinção vs concentração de TBZ (mol/L) para as bandas em 405 (AgNPs isoladas) e 798 nm (AgNPs agregadas) para o método AMP. **C)** Imagens (a partir de fotos de celular) do coloide de Ag para diversas concentrações de TBZ do método AMP, com as concentrações utilizadas para as imagens TEM marcadas com uma esfera vermelha.

Na Figura 21A (método AMP) são observadas a diminuição da banda em 406 nm e o surgimento da banda > 600 nm com o aumento da concentração de TBZ, assim como visto

para o método APE. No entanto, essas mudanças ocorrem em concentrações diferentes. Na faixa de concentração entre $6,9 \times 10^{-8}$ e $9,7 \times 10^{-7}$ mol/L, ocorre a diminuição contínua da banda em 406 nm. Na concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L observa-se uma redução significativa na extinção do *plasmon* em 406 nm, juntamente com o surgimento do *plasmon* > 600 nm, seguida do que chamamos de concentração crítica, que está em $2,3 \times 10^{-6}$ mol/L para o método AMP ($9,0 \times 10^{-6}$ mol/L para o método APE), indicando uma forte agregação coloidal induzida pelo TBZ. Além disso, no método AMP, diferentemente do método APE, após a concentração de $2,3 \times 10^{-6}$ mol/L, à medida que a concentração de TBZ aumenta, tanto o *plasmon* em 406 nm quanto o *plasmon* dos agregados > 600 nm continuam diminuindo (Figura 21B), ou seja, todo o espectro é deslocado para baixo (menores valores de extinção). Isto sugere uma degradação do coloide, por excesso de agregação, o que é consistente com as mudanças de cor deste coloide, como mostram as imagens na Figura 21.

A cor do coloide muda de amarelado para esverdeado em $2,3 \times 10^{-6}$ mol/L (concentração crítica) e vai perdendo a cor a partir desta concentração de TBZ até tornar-se praticamente incolor, podendo-se ainda observar a olho nu partículas dispersas no coloide. Ainda no método AMP, Figura 21A, não se observou o surgimento da banda em 297 nm relativa ao TBZ em excesso na dispersão. Isto se dá, provavelmente, porque a concentração mais alta utilizada no método AMP método foi de $3,2 \times 10^{-5}$ mol/L e tal banda foi observada a partir da concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L no método APE.

O mesmo efeito relacionado a agregação coloidal induzida por analito também é relatado por Hoang *et al.*[42] em que os autores realizaram a detecção do pesticida tiram por meio da técnica de colorimetria utilizando coloide de Ag reduzido com borohidreto de sódio e estabilizado com polivinilpirrolidona (PVP) ou poli-hexanida (PHMB). Os autores relataram que para a AgNPs-PHMB a banda das AgNPs isoladas decresce à medida que aumenta a concentração de tiram, com o aparecimento de uma nova banda em maiores comprimentos de onda, além da mudança de cor do coloide de amarelo para rosa claro, indicando a agregação coloidal induzida pelo tiram [42].

4.4. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ pelos métodos APE e AMP

As medidas de DLS e potencial zeta foram realizadas para ambos os métodos (APE e AMP). Essas medidas complementam os estudos de UV-Vis para analisar os efeitos que as concentrações do TBZ causam na agregação das AgNPs. A Tabela 7 mostra os valores

das medidas de DLS do diâmetro das AgNPs (e seus agregados) em nm na ausência e presença de TBZ ($3,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) pelo método APE.

Tabela 7: Valores do diâmetro (d) das AgNPs (e seus agregados) na ausência e presença de TBZ obtidos via DLS (método APE). Coloide S3.

[TBZ] (mol/L)	Medida 1 (d.nm)	Medida 2 (d.nm)	Medida 3 (d.nm)	Média (d.nm)	Erro ($\pm$) (d.nm)	PDI
AgNPs	84,4	89,9	89,8	87,3	2,7	0,47
$3,0 \times 10^{-8}$	87,2	89,6	89,8	88,9	1,4	0,47
$6,0 \times 10^{-8}$	84,9	85,2	86,8	85,6	1,0	0,46
$9,0 \times 10^{-8}$	87,9	85,7	88,2	87,3	1,3	0,43
$1,0 \times 10^{-7}$	84,7	86,2	90,0	87,0	2,7	0,42
$3,0 \times 10^{-7}$	86,5	89,1	89,4	88,3	1,5	0,47
$6,0 \times 10^{-7}$	88,7	86,6	91,7	89,0	2,5	0,48
$9,0 \times 10^{-7}$	94,4	91,4	96,7	94,2	2,6	0,51
$1,0 \times 10^{-6}$	96,7	102,8	98,0	99,2	3,1	0,52
$3,0 \times 10^{-6}$	89,4	89,9	92,7	90,7	1,7	0,49
$6,0 \times 10^{-6}$	121,1	129,7	129,8	126,9	4,9	0,55
$9,0 \times 10^{-6}$	422,4	442,3	429,2	431,3	10,1	0,26
$1,0 \times 10^{-5}$	398,4	376,3	510,5	428,4	71,9	0,28
$3,0 \times 10^{-5}$	438,7	616,4	535,6	530,2	88,9	0,27
$6,0 \times 10^{-5}$	401,4	798,1	783,6	661,0	225,0	0,29
$9,0 \times 10^{-5}$	527,3	450,2	477,0	484,8	39,1	0,31
$1,0 \times 10^{-4}$	452,3	403,2	689,4	515,0	153,0	0,32

O diâmetro médio das AgNPs na ausência de TBZ obtidas pelo método APE foi de $87,3 \pm 2,7$ nm (diâmetro hidrodinâmico médio). O valor de diâmetro médio está de acordo com a literatura para suspensões coloidais de prata reduzidas com hidroxilamina [17,43]. Além do tamanho, as medidas de DLS fornecem informações sobre o índice de poli dispersividade (PDI), relacionado à distribuição das populações em relação ao tamanho das partículas. Os valores de PDI variam de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e homogênea é a amostra [44]. As AgNPs apresentaram PDI de 0,47, indicando que possuem mono dispersividade moderada [45]. À medida que adicionamos TBZ no coloide de Ag, é possível observar um aumento do tamanho do diâmetro hidrodinâmico médio, consistente com a agregação das AgNPs induzida pelo TBZ. Com o intuito de facilitar a observação da influência do TBZ, foi construída a Figura 22 (diâmetro médio das AgNPs e seus agregados) em nm vs log da concentração de TBZ em mol/L foi elaborada a partir dos resultados da Tabela 7.

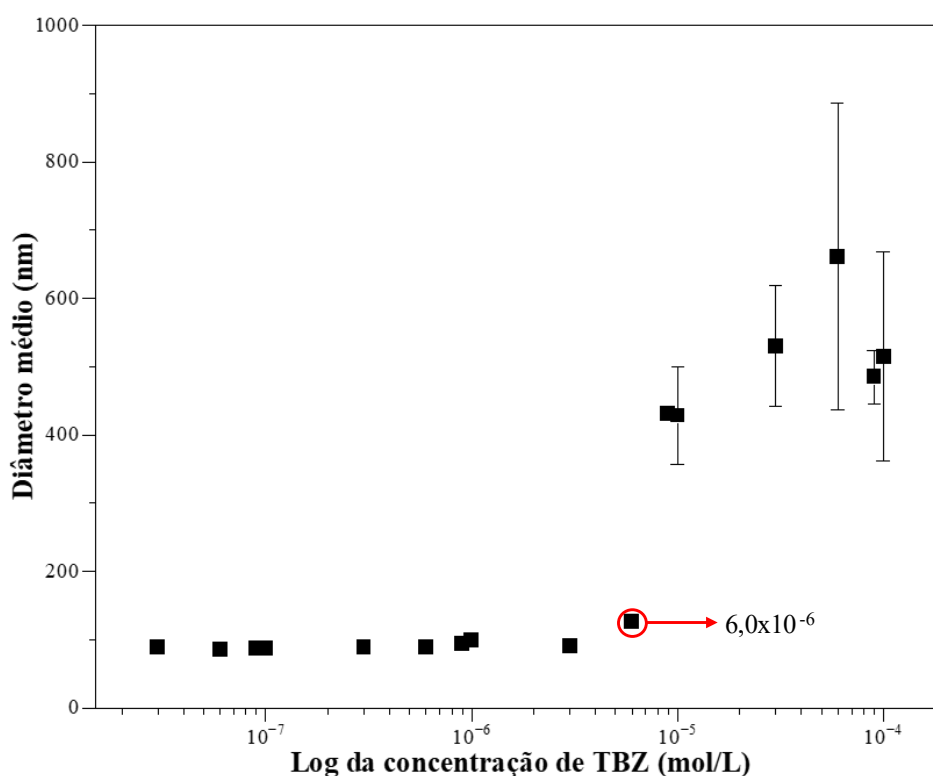


Figura 22: Diâmetro médio das AgNPs (e seus agregados) + TBZ vs log da concentração de TBZ (método APE). Concentrações de TBZ listadas na Tabela 7.

Em baixas concentrações ($6,0 \times 10^{-8}$ a $3,0 \times 10^{-6}$ mol/L) não há alteração no diâmetro médio. As mudanças iniciam-se na concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L justamente a concentração onde inicia-se as primeiras mudanças no espectro de extinção no UV-Vis, como mostra a Figura 22. A concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L apresenta diâmetro médio de $126,9 \pm 4,9$ nm, sendo um aumento de 39,6 nm, indicando a formação de agregados coloidais. As mudanças no diâmetro médio coincidem com os resultados da Seção 4.3. A concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L é a primeira concentração que ocorre a diminuição da banda do *plasmon* das nanopartículas isoladas (406 nm) e o surgimento de uma nova banda em maiores comprimentos de onda (671 nm – banda dos agregados). A partir da concentração crítica no UV-Vis ($9,0 \times 10^{-6}$ mol/L) observa-se um aumento significativo no tamanho dos agregados, sendo formado agregados com tamanhos próximos a $431,1 \pm 10,1$ nm, atingindo-se então um platô em relação ao diâmetro médio. Esses resultados corroboram as medidas de UV-Vis.

A seguir estão dispostos os resultados de DLS e potencial zeta realizados pelo método AMP. A

Tabela 8 mostra os valores das medidas de diâmetro (DLS) das AgNPs (e seus agregados) em nm na ausência e presença de TBZ ($4,0 \times 10^{-9}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ mol/L).

Tabela 8: Valores do diâmetro (d) das AgNPs (e seus agregados) na ausência e presença de TBZ obtidos via DLS (método AMP. **Coloide S1**)

[TBZ] (mol/L)	Medida 1 (d.nm)	Medida 2 (d.nm)	Medida 3 (d.nm)	Média (d.nm)	Erro ($\pm$) (d.nm)	PDI
AgNPs	72,1	72,6	70,0	71,6	1,4	0,34
$4,0 \times 10^{-9}$	74,1	75,4	74,0	74,5	0,8	0,39
$5,8 \times 10^{-8}$	71,9	70,5	72,2	71,5	0,8	0,52
$1,2 \times 10^{-7}$	72,3	73,0	73,6	73,0	0,6	0,54
$1,6 \times 10^{-7}$	73,8	75,3	75,2	74,8	0,8	0,54
$6,3 \times 10^{-7}$	78,5	75,1	76,7	76,8	1,6	0,55
$1,3 \times 10^{-6}$	113,2	126,5	142,5	127,4	14,6	0,56
$2,8 \times 10^{-6}$	262,4	378,5	407,8	349,5	76,8	0,32
$3,2 \times 10^{-6}$	462,8	501,8	558,1	507,5	47,9	0,31
$7,6 \times 10^{-6}$	637,6	630,6	779,3	682,5	83,9	0,31
$1,4 \times 10^{-5}$	624,3	810,9	801,3	745,5	105,0	0,32
$1,7 \times 10^{-5}$	620,6	729,8	658,0	669,4	55,4	0,38
$6,3 \times 10^{-5}$	672,4	643,9	628,0	648,1	22,4	0,39
$1,3 \times 10^{-4}$	549,0	675,8	598,9	607,9	63,8	0,52

Conforme podemos observar na

Tabela 8, as AgNPs na ausência de TBZ apresentam uma média de tamanho de $71,6 \pm 1,4$ nm (diâmetro hidrodinâmico médio) e PDI de 0,34. O valor do diâmetro médio diverge ligeiramente em relação à medição realizada pelo método AMP devido ao fato de se tratar de uma suspensão coloidal diferente. Porém, tal valor também está de acordo com a literatura para suspensões coloidais de prata [17,43], com o PDI (0,34) indicando uma monodispersividade moderada [45]. Além disso, conforme observado no método APE, foi possível notar o aumento do diâmetro médio com o aumento da concentração de TBZ.

A Figura 23 (diâmetro médio das AgNPs e seus agregados) em nm vs log da concentração de TBZ em mol/L) foi elaborada a partir dos resultados da

Tabela 8 com o intuito de melhor ilustrar os efeitos que o TBZ induz na agregação das AgNPs (método AMP).

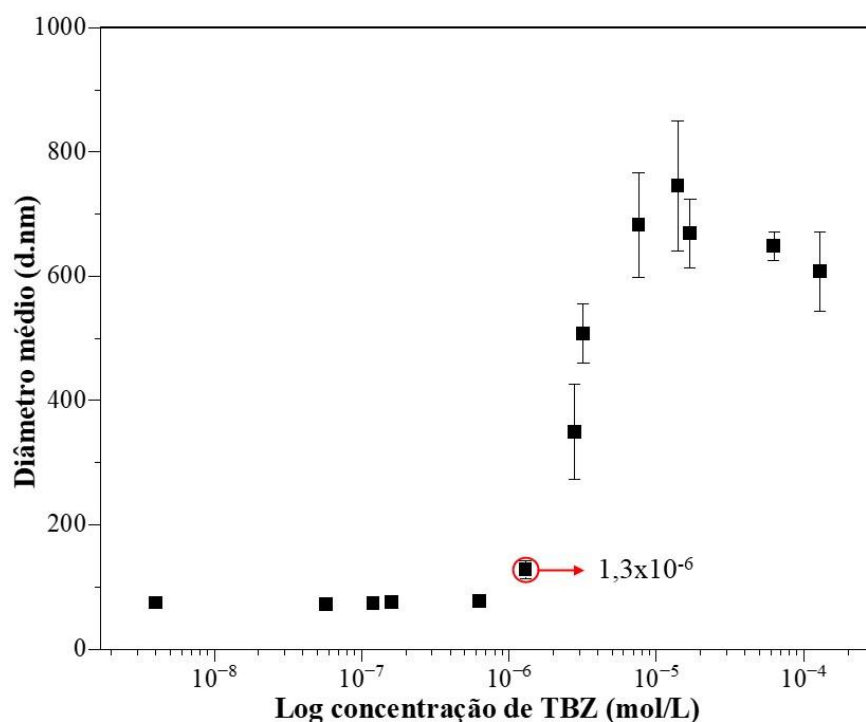


Figura 23: Diâmetro médio das AgNPs (e seus agregados) + TBZ vs log da concentração de TBZ (método AMP). Concentrações de TBZ listadas na

Tabela 8.

Na Figura 23 é possível observar que em baixas concentrações de TBZ não ocorre mudança significativa no diâmetro médio das AgNPs, ficando em torno 71,6 a 74,8 nm. Para a concentração de $1,3 \times 10^{-6}$ mol/L de TBZ o diâmetro médio é de $127,4 \pm 14,6$ nm, sendo um aumento de 55,8 nm. Esta mudança sugere o início da formação de agregados induzidos pelo TBZ. A partir desta concentração é possível observar um aumento abrupto do diâmetro dos agregados, atingindo 745 nm para a concentração de $1,4 \times 10^{-5}$ mol/L. Ainda na concentração de $1,3 \times 10^{-6}$ mol/L de TBZ os efeitos de agregação das AgNPs induzidos pelo TBZ coincidem com as medidas de extinção no UV-Vis realizadas na seção anterior (4.3), correspondendo ao espectro em que se tem a primeira queda significativa da banda com máximo em 413 nm (AgNPs isoladas) e o surgimento da banda em maiores comprimentos de onda (agregados). Esses resultados reforçam que nesta concentração de TBZ ($1,3 \times 10^{-6}$ mol/L) ocorrem mudanças mais significativas relacionadas ao processo de agregação das AgNPs para o método AMP.

Complementando a análise da formação dos agregados das AgNPs induzidos pelo TBZ, foi estudado o mesmo sistema via potencial Zeta para comparar com os resultados de UV-Vis e DLS. A Tabela 9 mostra os valores de potencial Zeta das AgNPs na ausência e presença de TBZ nas concentrações de $6,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L para o método APE. A Tabela 10 mostra valores de potencial Zeta das AgNPs na ausência e presença de TBZ em diversas concentrações ($4,0 \times 10^{-9}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ mol/L) para o método AMP.

Tabela 9: valores de potencial Zeta das AgNPs (e seus agregados) na ausência e presença de TBZ (método APE).

[TBZ] (mol/L)	Medida 1 (mV)	Medida 2 (mV)	Medida 3 (mV)	Média (mV)	Erro (mV)
AgNPs	-42,7	-40,8	-42,2	-41,9	0,9
$3,0 \times 10^{-8}$	-40,7	-40,4	-38	-39,7	1,4
$6,0 \times 10^{-8}$	-41,9	-42,3	-45,1	-43,1	1,7
$9,0 \times 10^{-8}$	-41,4	-41,7	-42,3	-41,8	0,4
$1,0 \times 10^{-7}$	-42,6	-41,4	-40,7	-41,5	0,9
$3,0 \times 10^{-7}$	-38,5	-37,6	-36	-37,3	1,2
$6,0 \times 10^{-7}$	-35,6	-36,5	-37,5	-36,5	0,9
$9,0 \times 10^{-7}$	-30,6	-29,4	-29,9	-29,9	0,6
$1,0 \times 10^{-6}$	-34,6	-33,1	-33,1	-33,6	0,8
$3,0 \times 10^{-6}$	-27,9	-28,2	-28,4	-28,1	0,2
$6,0 \times 10^{-6}$	-18,5	-17,2	-15,3	-17	1,6
$9,0 \times 10^{-6}$	-10,8	-8,8	-6,8	-8,8	2,0
$1,0 \times 10^{-5}$	-11	-9,7	-9,8	-10,1	0,7
$3,0 \times 10^{-5}$	-11,7	-12,8	-12	-12,1	0,5
$6,0 \times 10^{-5}$	15	17,9	18,9	17,2	2,0
$9,0 \times 10^{-5}$	21,8	21,6	22,4	21,9	0,4
$1,0 \times 10^{-4}$	22,8	25,3	25,6	24,5	1,5

Tabela 10: valores de potencial Zeta das AgNPs (e seus agregados) na ausência e presença de TBZ (método AMP).

[TBZ] (mol/L)	Medida 1 (mV)	Medida 2 (mV)	Medida 3 (mV)	Média (mV)	Erro (mV)
AgNPs	-28,2	-26,9	-28,4	-27,8	0,8
$4,0 \times 10^{-9}$	-23,3	-23,3	-24,3	-23,6	0,6
$5,8 \times 10^{-8}$	-23,0	-24,2	-24,3	-23,8	0,7
$1,2 \times 10^{-7}$	-20,1	-21,9	-22,3	-21,4	1,2
$1,6 \times 10^{-7}$	-19,0	-20,7	-18,7	-19,5	1,1
$6,3 \times 10^{-7}$	-14,0	-11,4	-10,9	-12,1	1,7
$1,3 \times 10^{-6}$	-13,7	-14,0	-14,6	-14,1	0,5

$2,8 \times 10^{-6}$	-10,7	-13,1	-11,5	-11,8	1,2
$3,2 \times 10^{-6}$	-11,5	-12,4	-11,2	-11,7	0,6
$7,6 \times 10^{-6}$	-10,3	-11,2	-10,4	-10,6	0,5
$1,4 \times 10^{-5}$	-9,3	-8,8	-8,6	-8,9	0,3
$1,7 \times 10^{-5}$	-5,1	-4,9	-5,3	-5,1	0,2
$6,3 \times 10^{-5}$	9,9	11,0	5,2	8,7	3,1
$1,3 \times 10^{-4}$	13,8	16,8	15,3	15,3	1,5

Assim como para as medidas de DLS, a Figura 24 foi elaborada com o intuito de melhorar a visualização dos efeitos induzidos pelo TBZ no potencial zeta das AgNPs (e seus agregados) via método AMP. A Figura 24A mostra a média do potencial zeta em mV vs log da concentração de TBZ em mol/L para o método APE e foi elaborada a partir dos valores da Tabela 9. Enquanto a Figura 24B mostra a média do potencial zeta em mV vs log da concentração de TBZ em mol/L para o método AMP e foi elaborada a partir dos valores da Tabela 10.

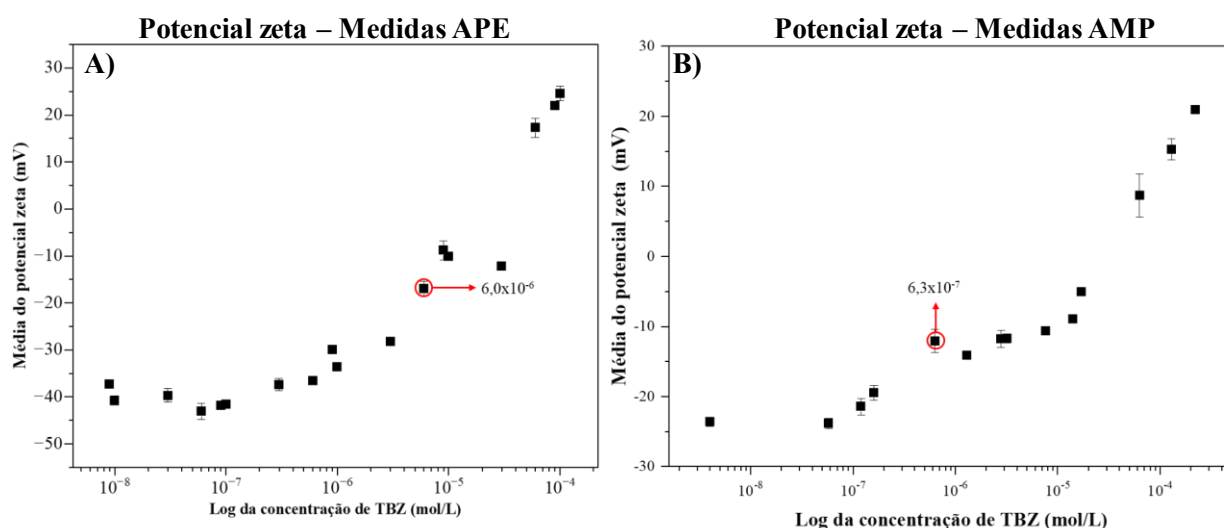


Figura 24: **A)** média do potencial zeta das AgNPs (e seus agregados) em mV vs log da concentração de TBZ (método APE). Concentrações de TBZ listadas na Tabela 10. **B)** média do potencial zeta das AgNPs (e seus agregados) em mV vs log da concentração de TBZ (método AMP). Concentrações de TBZ listadas na Tabela 10.

Devido às AgNPs serem de sínteses distintas, os valores de potencial zeta podem divergir entre as bateladas distintas. No entanto, é possível realizar a comparação de ambos métodos. No método APE o potencial zeta das AgNPs na ausência de TBZ apresenta valor médio de $-41,9 \pm 0,9$ mV, enquanto no método AMP apresentaram potencial zeta com valor médio de $-27,8 \pm 0,8$ mV. É importante observar que, para coloides serem considerados estáveis, o valor do potencial zeta deve ser menor que -30 mV ou maior que +30 mV [46].

Dessa forma, a síntese coloidal utilizada para as medidas do método APE está de acordo com a literatura e apesar do coloide de Ag do método AMP não estar abaixo dos -30 mV, está bem próximo desse valor e apresentou a estabilidade necessária. Conforme o TBZ é adicionado ao coloide de Ag, os valores de potencial zeta aumentam (tornam-se menos negativos). Nota-se que, na concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L (método APE), ponto em destaque na Figura 24A, o valor médio do potencial zeta é de $-17 \pm 1,6$ mV, com um aumento de 24,9 mV (tornando-se menos negativo) em comparação às AgNPs na ausência de TBZ. As medidas de potencial zeta coincidem com o observado para as medidas de DLS e UV-Vis, sendo dessa forma, a concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L que apresenta mudanças significativas que indicam a formação de agregados induzidos pelo TBZ. Ao observar o valor do potencial zeta na concentração de $1,3 \times 10^{-6}$ mol/L (método AMP), ponto em destaque na Figura 24B, discutida nas medidas de DLS e extinção no UV-Vis para o método AMP, o potencial é de $-14,1 \pm 0,5$ mV, tendo aumentado significativamente em comparação às AgNPs na ausência de TBZ ($-27,8 \pm 0,8$ mV). O aumento do potencial zeta observado em ambos os métodos deve estar na origem do processo de agregação induzido pelo TBZ, sendo responsável pela diminuição da repulsão eletrostática entre as AgNPs, promovendo assim a agregação do coloide de Ag.

No trabalho de Detsr e Seeharaj [47], os autores realizaram a detecção da glutathione (GHS - $C_{10}H_{17}N_3O_6S$) em diversas concentrações (0,1 a 250 nM) por meio da técnica de colorimetria. Neste trabalho os autores sintetizaram nanopartículas esféricas de Ag modificadas com ácido ftálico reduzidas com borohidreto de sódio. Por meio das técnicas de UV-Vis e potencial zeta, os autores observaram os mesmos indícios de agregação relatados em nossos resultados (mudança do espectro de UV-Vis, diminuição do potencial zeta e alteração de cor do coloide). Tais mudanças foram observadas a partir da concentração de 50 nM de GHS, com alteração espectral do UV-Vis, ocorrendo a diminuição da banda do *plasmon* (nanopartículas isoladas) e o surgimento da banda em maiores comprimentos de onda (agregados). Observaram ainda o aumento do potencial zeta de -35,7 mV para -18,8 mV, consistente com a formação de agregados de AgNPs devido à diminuição da repulsão eletrostática proporcionada pela adsorção das GHS [47]. O método de adição utilizado não é relatado por Detsr e Seeharaj, porém, com as imagens utilizadas no artigo é possível deduzir que os autores realizaram as medidas pelo método APE.

Semelhante aos resultados discutidos aqui, no trabalho de Alam *et al.* [48] também foi possível observar a formação de agregados das AgNPs (reduzidas com ácido tânico) por meio das técnicas de UV-Vis, DLS e potencial zeta, na detecção da melamina ($C_3H_6N_6$) em

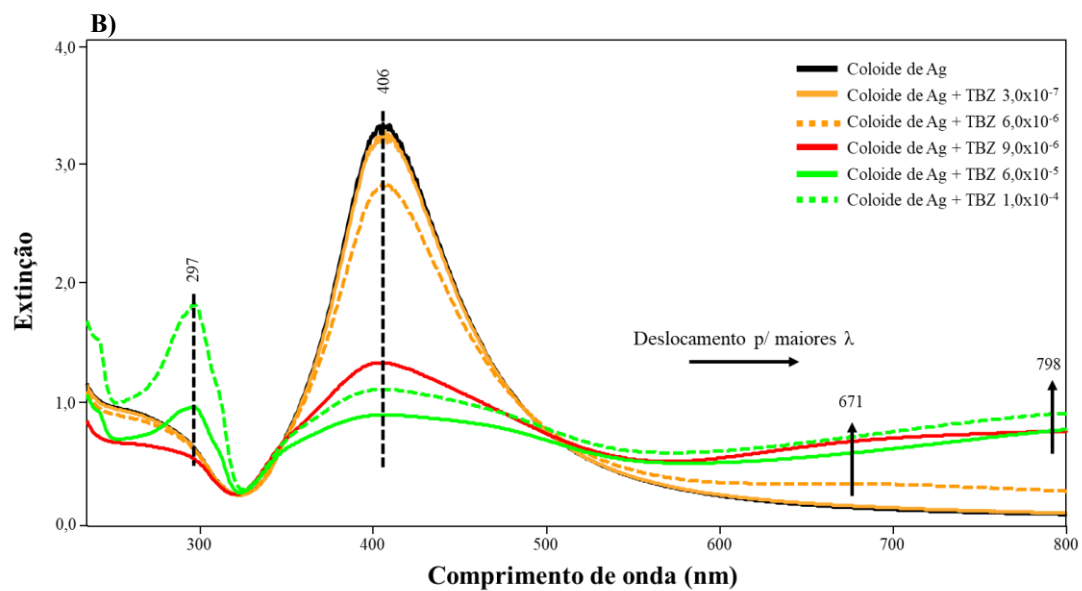
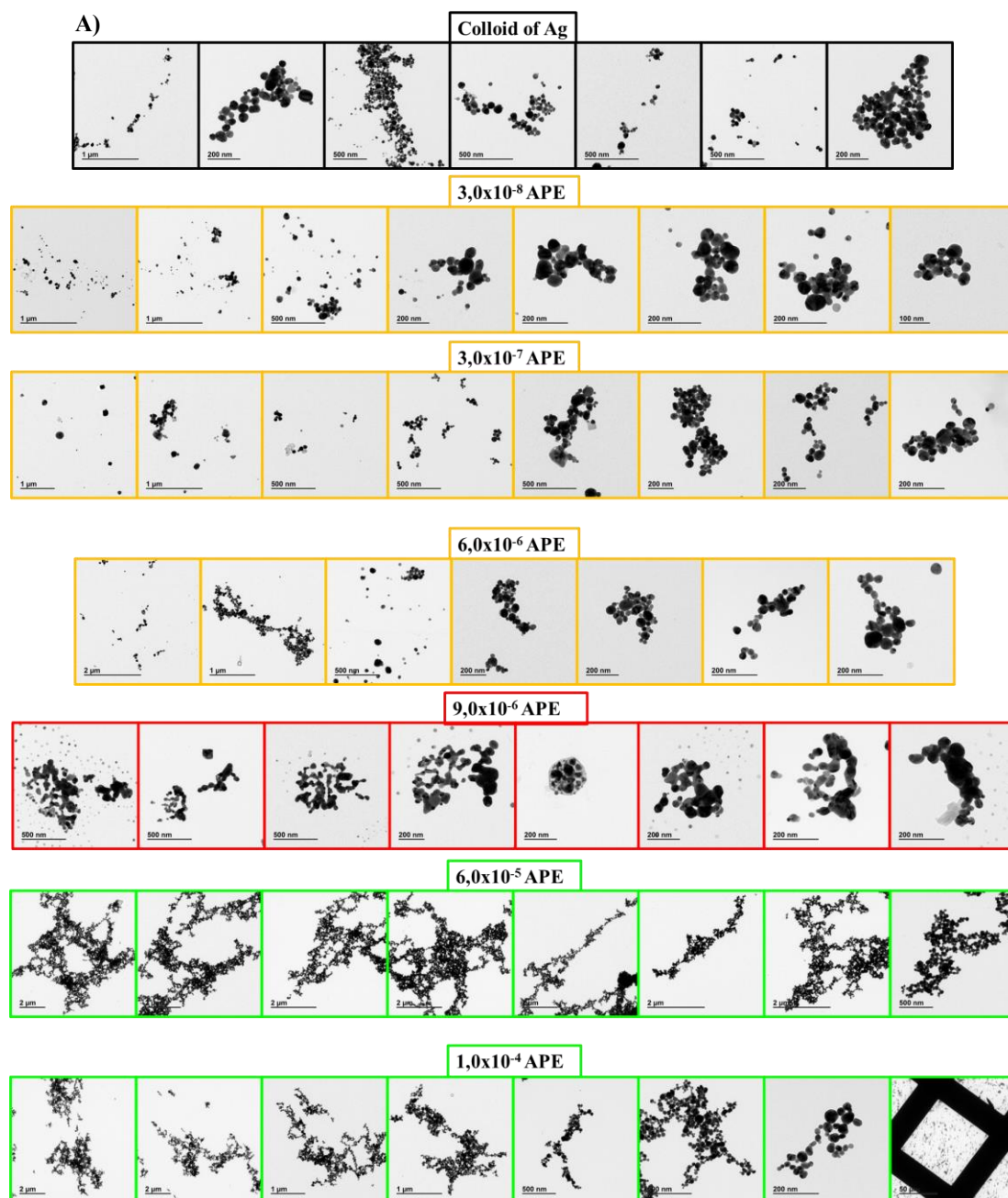
diversas concentrações (0 a 4 μM). Os autores relacionaram a formação de agregados a adição de 5 μL de melamina no coloide de Ag e observaram via espectros de extinção a diminuição do *plasmon* referente às AgNPs isoladas (400 nm) e o surgimento de uma nova banda em maiores comprimentos de onda (540 nm). Por meio da técnica DLS observaram um aumento de 31,3 nm para 168,9 nm do diâmetro das AgNPs na presença de melamina (5 μL). Nas medidas de potencial zeta observaram um aumento de -40,1 para -12,2 mV na presença de 5 μL de melamina. Apesar dos autores apresentarem as imagens de MET, não relacionaram os agregados com nenhum tipo de mecanismo de agregação, porém os agregados eram predominantemente lineares. O método de adição não é citado no artigo, porém, podemos inferir pelas imagens mostradas no artigo que o método utilizado foi o APE [48].

4.5. Imagens de MET em ambos os métodos APE e AMP

Com o intuito de estudar as possíveis diferenças na morfologia dos agregados que cada método induz, foram realizadas as medidas de imagens MET. Porém, é importante ressaltar que as medidas foram realizadas pelo mestrando em seu estágio BEPE na Espanha, supervisionado pelo Dr. Santiago Sanchez-Cortés. Desta forma, as medidas de UV-Vis foram repetidas para podermos correlacionar de maneira direta as mudanças morfológicas e os espectros de extinção de cada concentração estudada.

Método APE – Figura 25A (MET) e 25B (UV-Vis)

A Figura 25 apresenta imagens de microscopia MET com seus respectivos espectros de extinção para o método APE. Foram realizadas imagens para baixas concentrações ($3,0 \times 10^{-8}$, $3,0 \times 10^{-7}$ e $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L), na concentração crítica ($9,0 \times 10^{-6}$ mol/L) e em altas concentrações ($6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) de TBZ. Na Figura 25A as imagens de MET do coloide de Ag na ausência do TBZ apresentam as AgNPs com diâmetros entre 40 e 70 nm, além da formação de alguns agregados, que podem ter ocorrido devido a preparação (secagem) da amostra no *grid* ou até mesmo geradas espontaneamente na dispersão. Porém, no espectro de extinção não há alteração que indique agregação coloidal (diminuição da banda em 406 nm e surgimento da banda >600 nm).



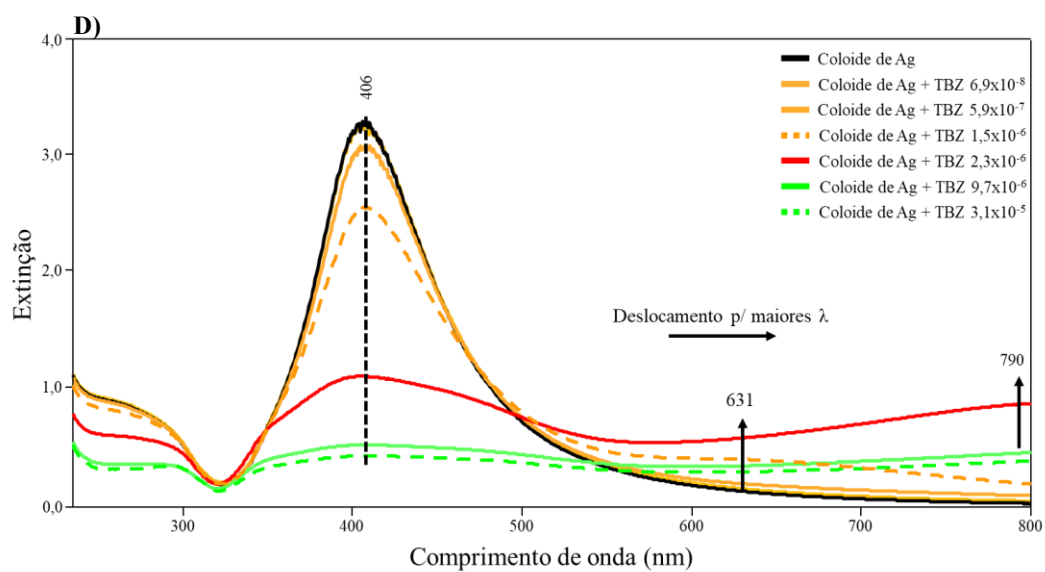
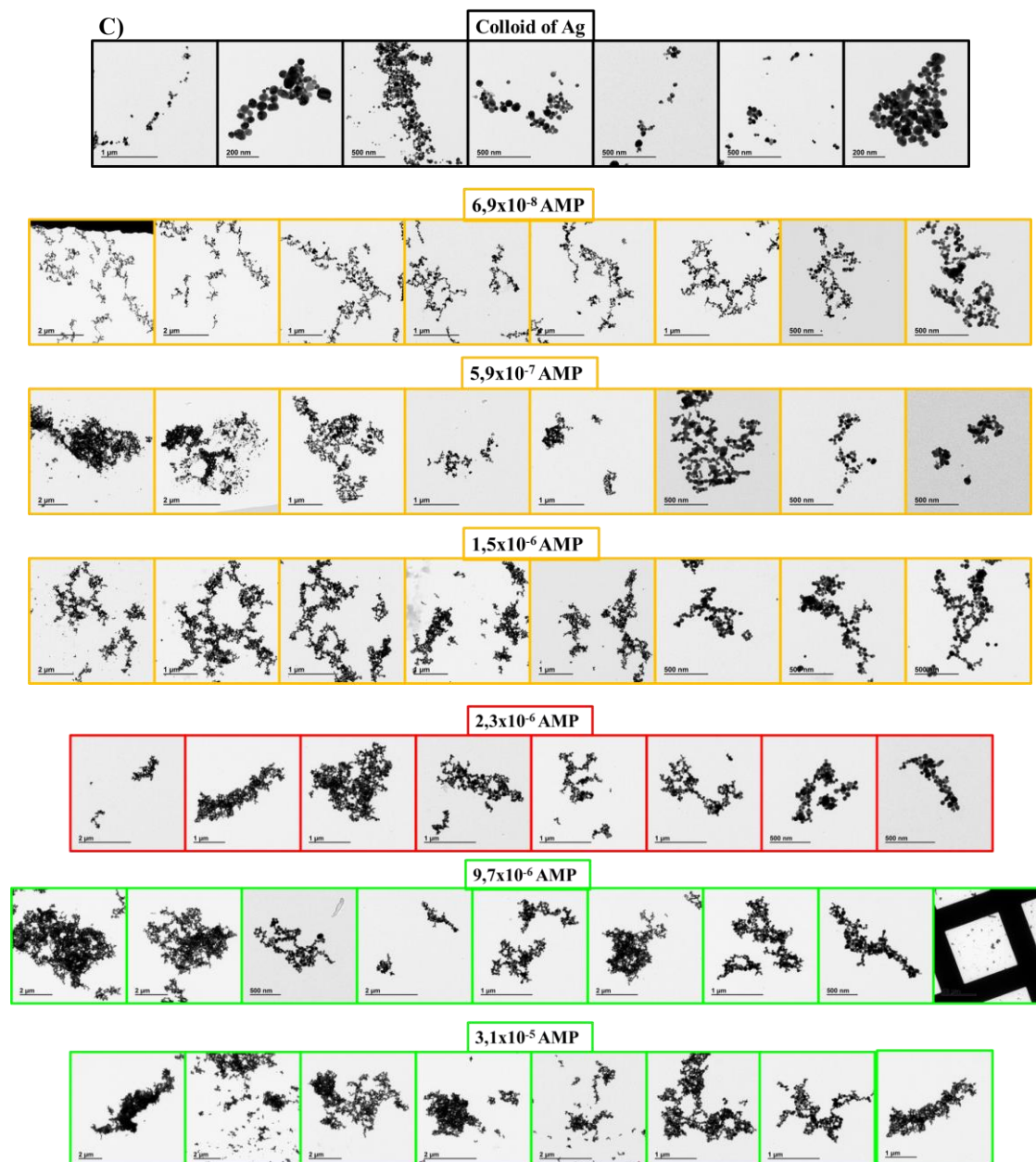


Figura 25: **A)** imagens de microscopia MET do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ nas mesmas concentrações dos espectros de extinção. e **B)** espectros de extinção do coloide de Ag na ausência (preto) e presença de TBZ em baixas concentrações $3,0 \times 10^{-8}$, $3,0 \times 10^{-7}$ e $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L (amarelo), na concentração crítica $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L (vermelho) e em altas concentrações $6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L (verde). As medidas de **A** e **B** foram realizadas pelo método APE. **C)** Imagens de microscopia MET do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ nas mesmas concentrações dos espectros de extinção. e **D)** espectros de extinção do coloide de Ag na ausência (preto) e presença de TBZ em baixas concentrações $6,9 \times 10^{-8}$, $5,9 \times 10^{-7}$ e $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L (amarelo), na concentração crítica $2,3 \times 10^{-6}$ mol/L (vermelho) e em altas concentrações $9,7 \times 10^{-6}$ e $3,1 \times 10^{-5}$ mol/L (verde). As medidas de **C** e **D** foram realizadas pelo método AMP.

As imagens de MET na Figura 25A para baixas concentrações de TBZ para o método APE (região contornada em amarelo), referentes as concentrações $3,0 \times 10^{-8}$, $3,0 \times 10^{-7}$ e $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L, revelam que os agregados formados são, de modo geral, agregados compactos com tamanho < 500 nm. Seus respectivos espectros de extinção no UV-Vis apresentam apenas a diminuição gradual do *plasmon* em 406 nm, com exceção da concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L, que além desta diminuição tem o surgimento da banda dos agregados em > 600 nm, já sugerindo um início de agregação mais significativa do coloide.

Na concentração crítica $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L de TBZ, as imagens de MET na Figura 25A apresentam a formação de agregados com tamanhos semelhantes aos observados anteriormente e as AgNPs parecem estar coalescendo (“fundindo aos agregados”). Isto pode ter ocorrido devido algum erro na preparação da amostra que não ocorreu para as outras imagens analisadas. Porém, temos outras imagens para uma síntese de coloide realizada em um outro dia. A Figura 26 mostra as imagens de MET nas concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L, $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L e $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L de TBZ pelo método APE.

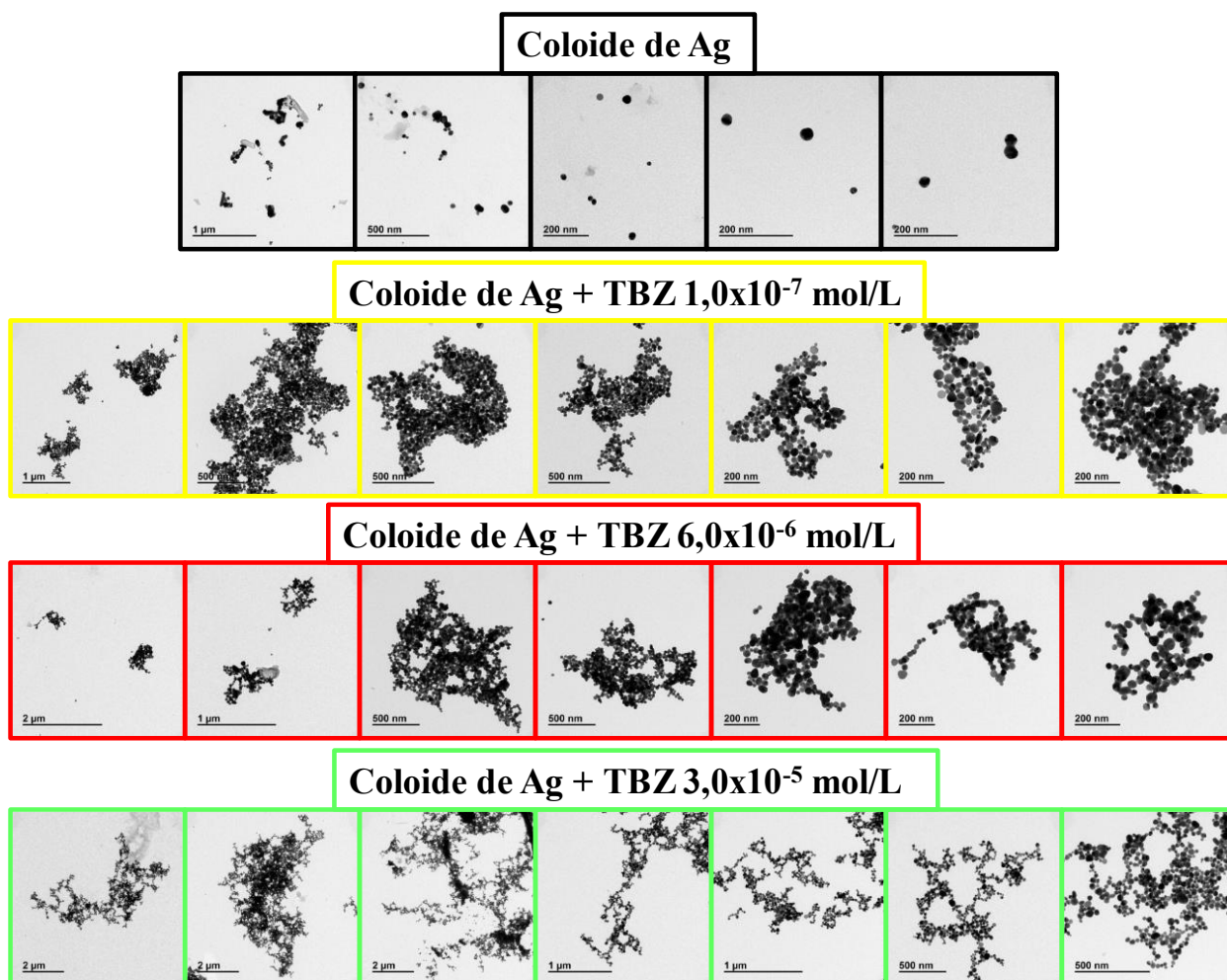


Figura 26: imagens de microscopia MET do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ nas mesmas concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$, $6,0 \times 10^{-6}$ e $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L, realizadas pelo método APE.

Na Figura 26 pode-se observar na concentração de $6,0 \times 10^{-6}$, a mais próxima da concentração crítica, a formação de agregados compactos, ou seja, observa-se o mesmo padrão encontrado na Figura 25A. Isso vale para as concentrações baixas ($1,0 \times 10^{-7}$ mol/L) e altas ($3,0 \times 10^{-5}$ mol/L). No espectro de extinção da concentração de $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L de TBZ, a diminuição da banda em 406 nm é abrupta e de cerca 55 % em relação ao espectro do coloide de Ag puro, com um aumento na intensidade da extinção em 671 nm de quase 3 vezes (o máximo da banda desloca-se de 631 para 798 nm).

Em altas concentrações de TBZ ($6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) as imagens de MET na Figura 25A mostram agregados com formatos mais ramificados e maiores que 2 μm. Os espectros de UV-Vis para estas concentrações de TBZ voltam a apresentar uma queda gradual da banda em 406 nm, o crescimento da banda em <600 nm, com seu máximo

deslocando-se para maiores comprimentos de onda, e o surgimento da banda do TBZ livre na dispersão (não adsorvido às AgNPs e seus agregados) em 297 nm.

Método AMP – Figura 25C (MET) e 25D (UV-Vis)

As imagens de MET na Figura 25C para o método AMP em baixas concentrações ($6,9 \times 10^{-8}$, $5,9 \times 10^{-7}$ e $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L) mostram agregados mais ramificados, ao contrário do observado para o método APE, e tamanhos até 2 μm , de modo geral. Porém, os espectros de extinção acompanham o mesmo padrão do observado no método APE: diminuição gradual da banda em 406 nm e surgimento da banda >600 nm.

As imagens de MET da concentração crítica ($2,3 \times 10^{-6}$ mol/L) na Figura 25C já passam a apresentar agregados majoritariamente mais compactos, com o espectro de extinção da concentração de $2,3 \times 10^{-6}$ mol/L de TBZ apresentando uma diminuição abrupta de 66% da banda em 406 nm com o máximo da banda dos agregados sendo deslocado de 631 nm para 790 nm.

Já em altas concentrações ($9,7 \times 10^{-6}$ e $3,1 \times 10^{-5}$ mol/L – Figura 25C) os agregados tornam-se relativamente mais compactos (mais “densos”) com dimensões maiores que 2 μm , de modo geral. Os espectros de UV-Vis para estas concentrações de TBZ, porém, diferentemente do observado para o método APE, caem de intensidade para todos os comprimentos de onda, sugerindo a degradação/precipitação do coloide de Ag, como discutido anteriormente.

4.6. Atribuição da banda em 247 cm^{-1} nos espectros SERS do TBZ

Nos espectros SERS obtidos neste trabalho, o surgimento da banda em 247 cm^{-1} nos levou a investigar qual vibração é referente a esta banda. A região em baixa frequência nos espectros SERS tem a capacidade de fornecer informações sobre a interação das moléculas adsorvidas com o metal. Dessa forma, a Figura 27 mostra os espectros SERS/APE das concentrações de $9,9 \times 10^{-9}$ a $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L, referente a região entre 200 e 400 cm^{-1} e o gráfico de intensidade SERS vs concentração de TBZ.

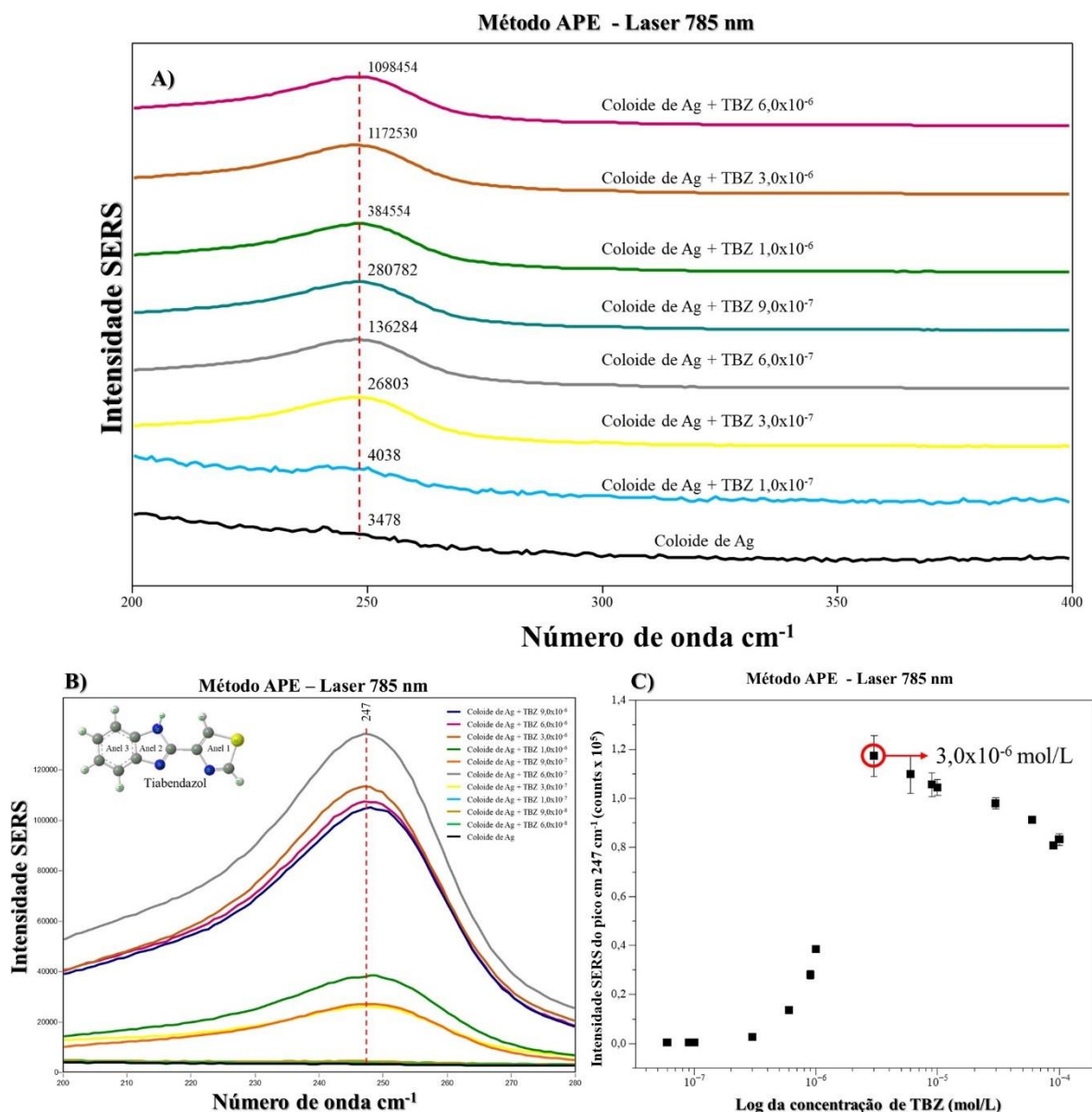


Figura 27: **A)** espectros SERS do TBZ nas concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$ a $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L, na faixa de 200 a 400 cm^{-1} , com os espectros plotados com linha de base. São dadas ainda as intensidades da banda em 247 cm^{-1} (espectros obtidos nas mesmas condições experimentais). **B)** Concentrações de $6,0 \times 10^{-8}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L na região entre 200 e 280 cm^{-1} com os espectros plotados em escala sem alteração no espectro. **C)** Intensidade SERS dada pelos valores da intensidade da banda em 247 cm^{-1} vs log da concentração de TBZ em todas as concentrações de $6,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L.

Apesar da Figura 27 apresentar apenas os espectros do método APE, em ambos os métodos há o surgimento da banda em 247 cm^{-1} e em ambos a intensidade da banda aumenta com a concentração de TBZ. Na Figura 27, observa-se que abaixo da concentração de $3,0 \times 10^{-7}$ mol/L não há a presença da banda em 247 cm^{-1} e, após o surgimento dessa banda

$1,2 \times 10^{-7}$ mol/L, nota-se que, com o aumento da concentração de TBZ, aumenta a banda em 247 cm^{-1} . A banda em 247 cm^{-1} surge a partir da concentração de $3,0 \times 10^{-7}$ mol/L, coincidindo com a primeira concentração em que surge o espectro do TBZ. Na Figura 27C é possível observar que a isoterma de adsorção apresenta um formato sigmoidal, conforme o obtido para as medidas de detecção do TBZ na seção 4.1.

Na literatura alguns trabalhos indicam que esta banda é referente a vibração Ag-Cl, como no artigo de Rivas *et al.* [49], em que os autores investigaram a adsorção de derivados de acridina, a quinacrina (QA) e 9-aminoacridina (9AA) na superfície de prata. Rivas *et al.* [49], realizaram testes mudando o pH do sistema adicionando HCl e observaram que em pH baixo, a banda referente a Ag-N em 225 cm^{-1} sofre sobreposição devido à grande quantidade de íons Cl^- , resultando na formação da banda em 242 cm^{-1} , à qual os autores associaram a banda Ag-Cl. No entanto, ao contrário do que ocorre em nossos experimentos, não há adição de sal para aumentar a concentração de íons Cl^- , e mesmo assim é possível observar o surgimento da banda em 247 cm^{-1} . Já no trabalho de Guerrini *et al.* [50], os autores realizaram a detecção do dithiocarbamate calix[4]arene derivative (DTCX) utilizando AgNPs. Neste trabalho os autores relataram a banda em 245 cm^{-1} no espectro das AgNPs na ausência de DTCX e atribuíram a banda a vibração referente a Ag-Cl [50]. Porém, ao adicionarem DTCX nas concentrações de 10^{-7} a 10^{-4} mol/L, os autores relataram a diminuição da banda em 245 cm^{-1} e o surgimento da banda em 189 cm^{-1} , referente a vibração Ag-S [50]. Este efeito ocorre devido aos íons cloreto serem substituídos pelas moléculas de DTCX. Em nossas medidas não é possível observar a banda em 245 cm^{-1} na ausência de TBZ. O surgimento da banda com máximo em 247 cm^{-1} em nossos resultados se dá apenas quando aparecem as bandas referentes ao TBZ em todo o espectro SERS. Porém, nota-se que a banda em 247 cm^{-1} é assimétrica, sugerindo a sobreposição de duas bandas, uma centrada em 247 cm^{-1} , que poderia estar associada à ligação Ag-Cl, e outra em menor número

de onda, que poderia estar associada à ligação Ag-S. O surgimento da banda em 247 cm^{-1} apenas a partir de $3,0 \times 10^{-7}\text{ mol/L}$ de TBZ poderia estar relacionada com a agregação coloidal induzida pelo TBZ e a consequente amplificação do SERS em níveis que permitam a observação das bandas do TBZ e da ligação Ag-Cl.

No trabalho de Matulaitiene *et al.* [51], os autores realizaram a caracterização do anel imidazol utilizando o derivado de histamida do ácido lipóico (LAH) através da técnica SERS e cálculos DFT. Neste trabalho os autores estudaram a adsorção do LAH em eletrodo de prata, aplicando o potencial de 0,60 V, e observaram o surgimento da banda em 235 cm^{-1} [51]. A partir da modelagem teórica atribuíram a banda em 235 cm^{-1} ao estiramento Ag-S, sendo que os cálculos teóricos indicaram que a ligação Ag-S é prevista entre 249 e 252 cm^{-1} [51]. A Figura 28 mostra todas as estruturas moleculares dos analitos citados dos artigos selecionados nesta seção.

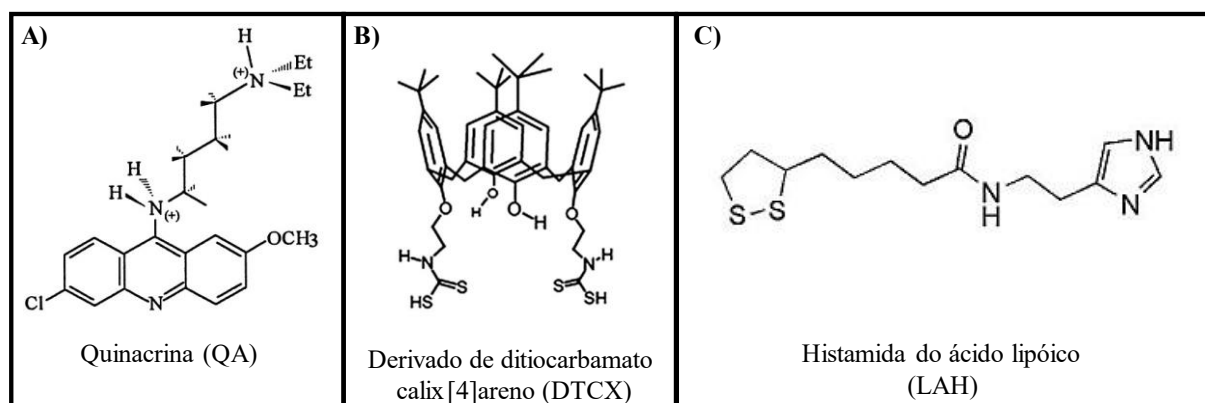


Figura 28: estrutura molecular da A) quinacrina estudada por Rivas *et al.* [47], B) derivado de ditiocarbamato calix[4]areno estudada por Guerrini *et al.* [48] e C) histamina do ácido lipóico estudada por Matulaitiene *et al.* [49].

Da mesma forma que foi realizado para o método APE, também foi realizado para o método AMP, com o objetivo de analisar se há alguma diferença em relação à banda de 247 cm^{-1} . Assim, a Figura 29 apresenta os espectros SERS/APE do TBZ nas concentrações de

$6,0 \times 10^{-8}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L, correspondentes à faixa entre 200 e 400 cm^{-1} , juntamente com o gráfico de intensidade SERS em função da concentração de TBZ.

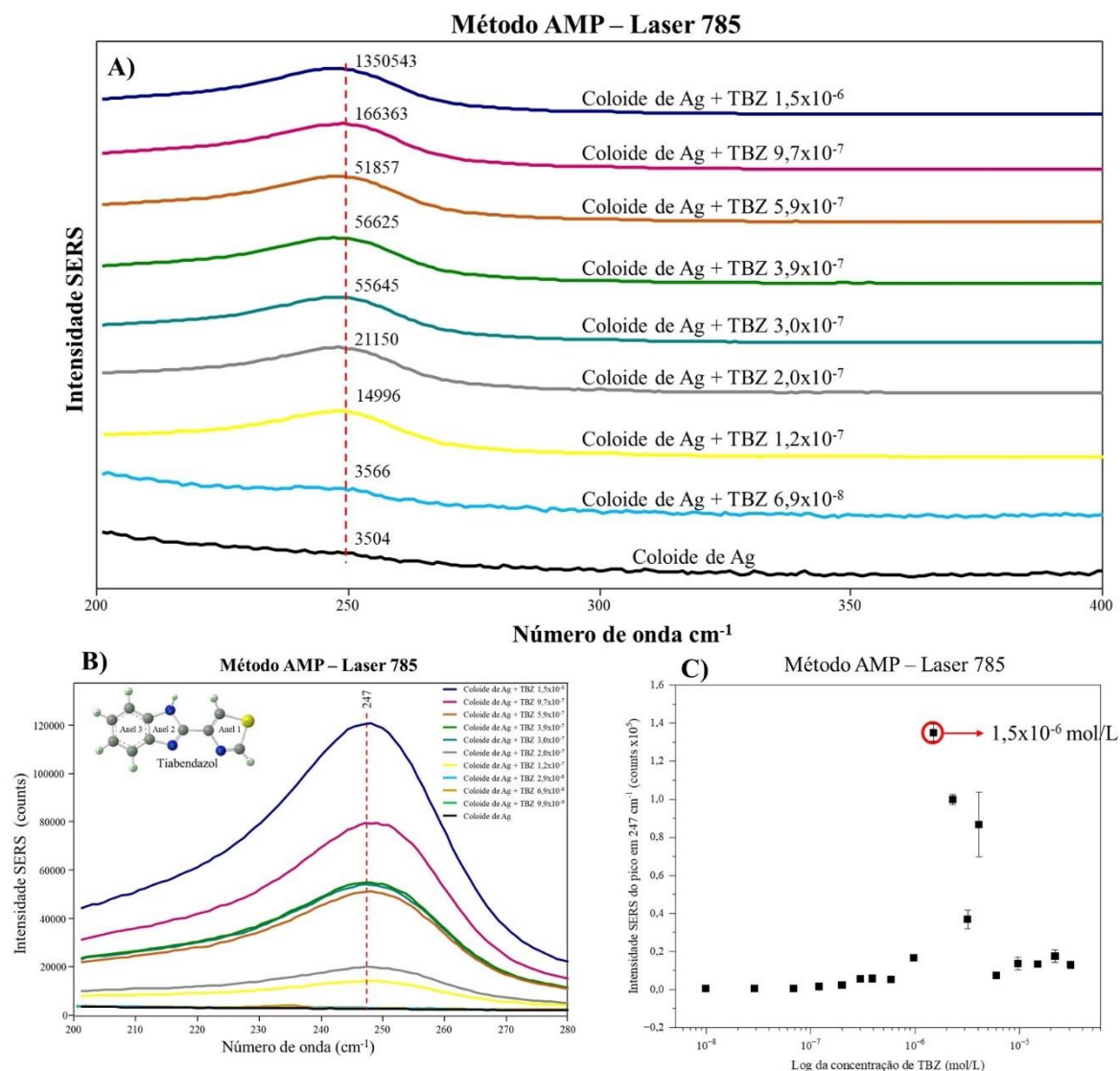


Figura 29: **A)** espectros SERS/AMP do TBZ nas concentrações de $6,9 \times 10^{-8}$ a $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L, na faixa de 200 a 400 cm^{-1} , com os espectros plotados com linha de base. São dadas ainda as intensidades da banda em 247 cm^{-1} (espectros obtidos nas mesmas condições experimentais). **B)** Concentrações de $6,9 \times 10^{-8}$ a $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L na região entre 200 e 280 cm^{-1} com os espectros plotados em escala sem alteração no espectro. **C)** Intensidade SERS dada pelos valores da intensidade da banda em 247 cm^{-1} vs log da concentração de TBZ em todas as concentrações de $9,9 \times 10^{-9}$ a $3,2 \times 10^{-5}$ mol/L.

Nas medidas realizadas para o método APE também foi possível observar as mesmas mudanças do método AMP, porém, em concentrações diferentes, sendo a concentração de $1,2 \times 10^{-7}$ mol/L a primeira que aparece a banda em 247 cm^{-1} . Tais mudanças indicam que,

mesmo em métodos de adição distintos ainda permanece o perfil do aparecimento da banda em 247 cm^{-1} , coincidindo com o surgimento das bandas referentes ao TBZ.

4.7. Influência dos diferentes lasers nas medidas SERS

Nas primeiras medidas realizadas neste trabalho, foram observadas algumas mudanças nos perfis espectrais que poderiam ser atribuídas ao método de adição ou aos diferentes lasers utilizados para a detecção. Por esse motivo, foram realizadas medidas em ambos os métodos (APE e AMP) utilizando diferentes lasers (532 e 785 nm) com o intuito de avaliar se as mudanças estavam relacionadas aos métodos ou aos diferentes lasers. Sendo assim, a Figura 30 mostra os espectros SERS de ambos os métodos (APE e AMP) em concentrações próximas ($1,0 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ APE e $1,5 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ AMP) e diferentes lasers (532 e 785 nm), além dos espectros Raman do pó de TBZ nos respectivos lasers.

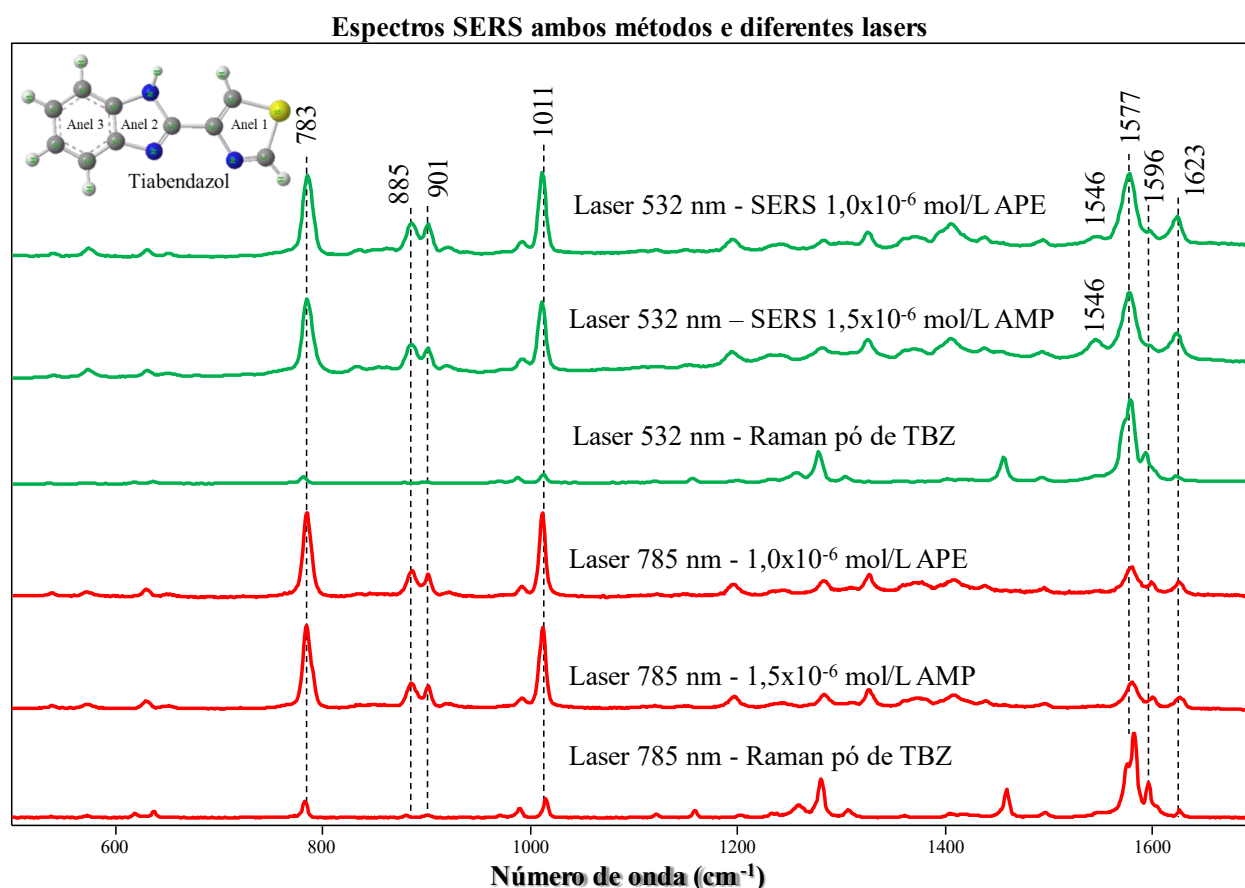


Figura 30: espectros SERS com laser 532 nm nas concentrações de $1,0 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ no método APE, $1,5 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ no método AMP e espectro Raman do pó de TBZ. Espectros SERS com laser 785 nm nas concentrações de $1,0 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ no método APE, $1,5 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ no método AMP e espectro Raman do pó de TBZ. Todos os espectros foram obtidos

com 10% de intensidade do laser, 1 de acumulação e 10 segundos de exposição. Espectros com correção de linha de base e normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”).

Independência do espectro Raman do TBZ em relação ao laser de excitação: importante observar que os espectros Raman do pó nos diferentes lasers não sofrem alteração nas intensidades relativas das bandas, mostrando que, independentemente do laser com o qual a molécula de TBZ é excitada, não há diferença no perfil do espectro Raman.

Independência do espectro SERS em relação ao método (APE x AMP): nota-se que para os espectros SERS obtidos com o mesmo laser, independentemente do método de adição do TBZ, o perfil espectral do sinal SERS se mantém.

(In)dependência do espectro SERS do TBZ com o laser de excitação: nos espectros SERS obtidos com o laser 532 nm, observa-se a amplificação das bandas em 783, 885, 901 e 1011 cm^{-1} em relação ao espectro Raman do TBZ, ou seja, a intensidade relativa destas bandas aumentou em relação às bandas em 1577, 1596 e 1623 cm^{-1} . O mesmo padrão é observado para o laser em 785 nm, porém, neste caso, a amplificação das bandas em menores números de onda (783, 885, 901 e 1011 cm^{-1}) em relação às bandas em maiores números de onda (1577, 1596 e 1623 cm^{-1}) é ainda maior que a amplificação observada para o laser em 532 nm. No caso do laser 785 nm, as bandas em menores números de onda passam a dominar o espectro SERS do TBZ, enquanto para o laser 532 nm, tais bandas passam a se equivaler, em termos de intensidade relativa, às bandas em maiores números de onda.

O padrão de amplificação mencionado acima origina, ao menos, outros dois questionamentos: i) por que as bandas em menor número de onda foram amplificadas preferencialmente em relação às bandas em maiores números de onda e ii) por que o laser em 785 nm produziu uma amplificação mais significativa destas bandas em menores números de onda em relação ao laser 532 nm?

i) A amplificação da região em menores números de onda se dá devido ao modo em que o TBZ adsorve na superfície das AgNPs, conforme citado na seção 4.1. A adsorção do TBZ se dá pelo anel 1, por meio dos átomos de S e N, com a molécula preferencialmente na perpendicular. Desta forma, os modos vibracionais relacionados ao anel 1, e que vibrem perpendicularmente à superfície das AgNPs, terão amplificação preferencial de acordo com as regras de seleção de superfície para SERS discutidas na seção 4.1. Esta interpretação é consistente com as atribuições dadas na Tabela 6 aos números de onda em 783, 885, 901 e 1011 cm^{-1} , enquanto as bandas em maiores números de onda são referentes aos anéis 2 e 3. Além disso, em teoria e considerando o mecanismo de amplificação proposto no modelo

eletromagnético, quanto mais próximas da frequência do laser de excitação (zero relativo) forem as frequências (ou números de onda) dos modos vibracionais do adsorbato, maior tende a ser a amplificação do sinal destas bandas do adsorbato [52]. Porém, é difícil quantificar se tal diferença na amplificação do sinal SERS seria significativa neste caso do TBZ. O mais provável seja mesmo que o mecanismo de adsorção do TBZ esteja prevalecendo.

ii) A amplificação preferencial do sinal SERS a partir do laser 785 nm em relação ao laser em 532 nm pode ser explicada pela relação de ressonância entre o laser e o espectro de extinção das AgNPs. Ainda em 1982, Blatchford *et al.* [53], trabalhando com piridina reportaram que a ressonância entre o laser de excitação e a banda de extinção promove um grande aumento na intensidade Raman. Consistente com a proposição de Blatchford *et al.*, o laser em 532 nm está em pré-ressonância com o *plasmon* das AgNPs isoladas e/ou do modo transversal do *plasmon* dos agregados de AgNPs, enquanto o laser em 785 nm está em pré-ressonância com o modo longitudinal do *plasmon* dos agregados das AgNPs, explicando a maior amplificação do sinal SERS do TBZ para o laser em 785 nm.

Com o intuito de melhor observar os efeitos dos diferentes lasers, a Figura 31 mostra os espectros de extinção do coloide de Ag na ausência e presença de TBZ na concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L e o espectro de absorção do TBZ na concentração de 10^{-4} mol/L com *inset* dos espectros SERS para os diferentes lasers (532, 633 e 785 nm).

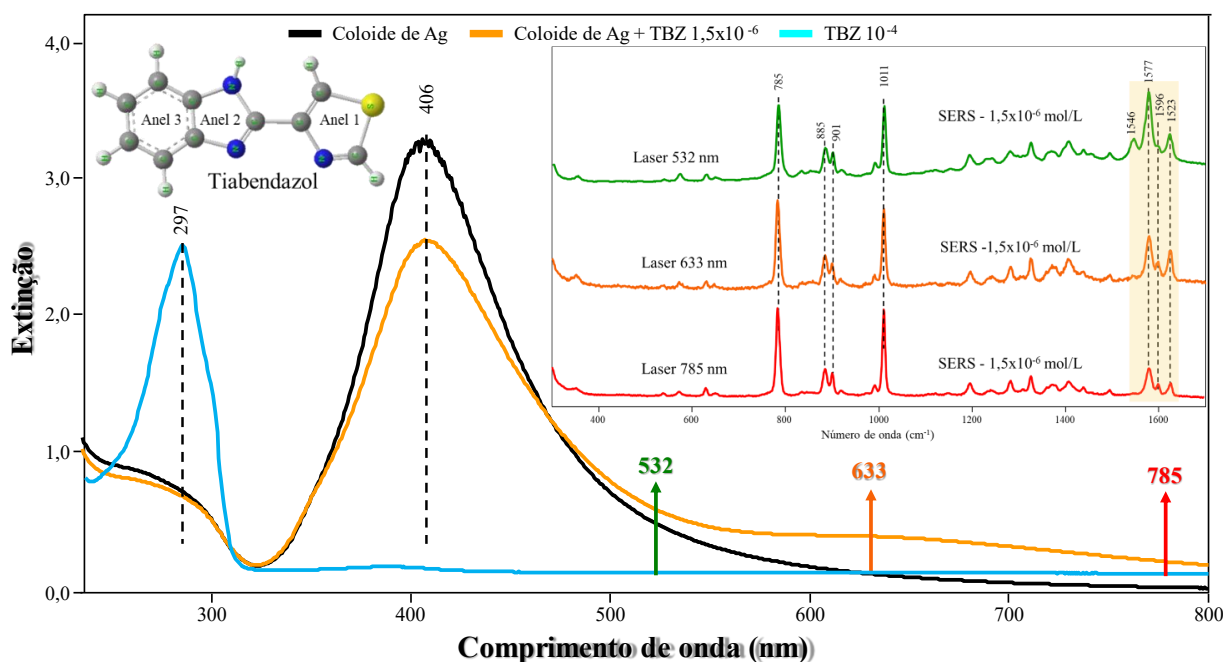


Figura 31: espectros de extinção do coloide de Ag na presença e ausência de TBZ na concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L e espectro de absorção do TBZ em água na concentração de 10^{-4} mol/L. *Inset* com os espectros SERS do TBZ na concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L nos lasers 532 nm (em verde), 633 nm (em laranja) e 785 nm (em vermelho). Os espectros do *inset* foram obtidos com 10% de intensidade do laser, 1 de acumulação e 10 segundos de exposição. Espectros normalizados (banda mais intensa com a mesma “altura”).

Nos espectros de extinção da Figura 31, é possível notar que o laser 532 nm é o mais próximo da ressonância com o plasmon das AgNPs (406 nm plasmon das AgNPs isoladas), essa ressonância é responsável pela amplificação das bandas próximas a 1600 cm^{-1} . À medida que o comprimento de onda do laser aumenta, nota-se uma maior amplificação das bandas em menores comprimentos de onda (entre 700 e 1000 cm^{-1}). A amplificação observada nos espectros dos lasers de maiores comprimentos de onda, se dá devido a ressonância dos lasers 633 e 785 nm estarem mais próximos ao plasmon dos agregados de AgNPs + TBZ.

Efeito parecido é observado por Om Prakasha [54], em que o autor investigou à adsorção do diimida tetracarboxílico 3,4,9,10-perileno (PTCDI) em filme de Ag nano-ilhas (AgNIF), utilizando a técnica SERS com vários comprimentos de ondas de excitação. A partir dos espectros de extinção no UV-Vis das AgNIF na presença de PTCDI, foi possível observar o plasmon em 561, 614 e 758 nm. Dessa forma, em busca de estudar a dependência do espectros SERS em função do laser incidido com a ressonância plasmônica, o autor utilizou os lasers de 514,5, 633, 785 e 830 nm. Nos lasers de 514 e 633 nm, foi observado uma amplificação em um maior número de bandas em comparação aos lasers 785 e 830 nm,

devido aos lasers em menores comprimentos de onda estarem sendo auxiliados pela ressonância plasmônica da AgNIF + PTCDI.

5. Conclusão

Influência dos métodos APE e AMP sobre o coloide de Ag e, por consequência, sobre a intensidade do sinal SERS

Fazendo uma análise geral dos resultados de extinção no UV-Vis, potencial zeta e imagens de microscopias ópticas e MET utilizados como forma de monitorar a agregação coloidal, é nítida a correlação entre as mudanças no coloide de Ag induzidas pelo TBZ e o padrão de intensidade do sinal SERS do TBZ em função de sua concentração no coloide. Ambos os métodos promoveram agregação coloidal, cujas concentrações críticas foram de $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L para o método APE e $2,3 \times 10^{-6}$ mol/L para o método AMP.

As isotermas de adsorção (intensidade SERS vs concentração TBZ) apresentaram relação direta com a agregação coloidal para valores maiores e menores que a concentração crítica. Em ambos os métodos, em baixas concentrações, formou-se uma primeira camada de TBZ favorecida pelo aumento da concentração de TBZ (“adsorção cooperativa”). A diferença ocorre em maiores concentrações: no método APE a isoterma atinge um patamar, revelando um excesso de TBZ na dispersão coloidal e uma possível formação de multicamadas; no método AMP observa-se uma queda abrupta do sinal SERS, a qual é associada à degradação da dispersão coloidal/precipitação.

Em relação aos agregados coloidais, no método APE, em baixas concentrações, os agregados formados foram preferencialmente mais compactos, enquanto em altas concentrações os agregados apresentaram formatos mais ramificados. Sendo assim, para o método APE, a agregação coloidal das AgNPs induzida pelo TBZ em baixas concentrações é governado pelo mecanismo RLCA e em altas concentrações é governado pelo mecanismo DLCA. Em contrapartida, no método AMP foi observado o oposto do método APE, ou seja, em baixas concentrações os agregados formados eram preferencialmente mais ramificados e em altas concentrações os agregados formados eram preferencialmente compactos. Tais efeitos sugerem uma inversão dos mecanismos DLCA e RLCA em função da concentração de TBZ em relação ao que foi determinado para o método APE.

Apesar das diferenças mencionadas, temos que em termos de limite de detecção do TBZ, os valores encontrados são próximos, sendo $5,9 \times 10^{-8}$ mol/L para o APE e $4,9 \times 10^{-8}$ mol/L para o AMP.

Mecanismo de adsorção

Independentemente do método de preparação das amostras, as regras de seleção de superfície para SERS sugerem uma adsorção via interações Ag-S e Ag-N (grupo tiazol), com o TBZ preferencialmente perpendicular à superfície das AgNPs, sendo a ligação Ag-S mais provável segundo cálculos teóricos de reatividade local (índices de Fukui). Além disso, as medidas SERS revelaram a presença da banda com máximo em 247 cm^{-1} , cuja assimetria sugere a sobreposição de duas bandas, possivelmente associadas às vibrações Ag-Cl e Ag-S.

Influência de diferentes lasers no espectro SERS

Por fim, foi observada uma dependência do perfil do espectro SERS com o laser de excitação. Os lasers em 532 e 785 nm originaram espectros Raman do TBZ com o mesmo perfil, predominando a banda em 1577 cm^{-1} . Porém, o espectro SERS revelou uma amplificação preferencial das bandas entre 783 e 1011 cm^{-1} , sendo tal amplificação ainda maior para o laser em 785 nm. Tal padrão é consistente tanto com a adsorção via átomos de S e N quanto com a ressonância entre o laser 785 nm e os agregados coloidais induzidos pelo próprio TBZ.

6. Referências

- [1] R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470035641>.
- [2] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.* 78 (1997) 1667–1670. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1667>.
- [3] C.J.L. Constantino, T. Lemma, P.A. Antunes, R. Aroca, Single-Molecule Detection Using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering and Langmuir–Blodgett Monolayers, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3674–3678. <https://doi.org/10.1021/ac0101961>.
- [4] S.L. Kleinman, R.R. Frontiera, A.-I. Henry, J.A. Dieringer, R.P. Van Duyne, Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 21–36. <https://doi.org/10.1039/C2CP42598J>.
- [5] T. Zhu, Y. Sun, W. Lu, G. Wang, X. Zhang, S. Chen, C. Zhang, Z. Li, B. Man, C. Yang, Theoretical and experimental investigation of the flexible Ag nano-tree@Cu mesh SERS substrate, *J. Alloys Compd.* 908 (2022) 164622. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2022.164622>.
- [6] H. Fu, W. Liu, J. Li, W. Wu, Q. Zhao, H. Bao, L. Zhou, S. Zhu, J. Kong, H. Zhang, W. Cai, High-Density-Nanotips-Composed 3D Hierarchical Au/CuS Hybrids for Sensitive, Signal-Reproducible, and Substrate-Recyclable SERS Detection, *Nanomaterials.* 12 (2022) 2359. <https://doi.org/10.3390/nano12142359>.
- [7] L.N. Furini, C.J.L. Constantino, S. Sanchez-Cortes, J.C. Otero, I. López-Tocón, Adsorption of carbendazim pesticide on plasmonic nanoparticles studied by surface-enhanced Raman scattering, *J. Colloid Interface Sci.* 465 (2016) 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.045>.
- [8] R.J.G. Rubira, S.A. Camacho, C.J.L. Constantino, S. Sanchez-Cortes, Increasing the sensitivity of surface-enhanced Raman scattering detection for s-triazine pesticides by taking advantage of interactions with soil humic substances, *J. Raman Spectrosc.* 53 (2022) 40–48. <https://doi.org/10.1002/jrs.6262>.
- [9] R.J.G. Rubira, L.N. Furini, C.J.L. Constantino, S. Sanchez-Cortes, SERS detection of prometryn herbicide based on its optimized adsorption on Ag nanoparticles, *Vib. Spectrosc.* 114 (2021) 103245. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2021.103245>.
- [10] F. Reyes Gómez, R. Rubira, S. Camacho, C. Martin, R. da Silva, C. Constantino, P. Alessio, O. Oliveira, J. Mejía-Salazar, Surface Plasmon Resonances in Silver Nanostars, *Sensors.* 18 (2018) 3821. <https://doi.org/10.3390/s18113821>.
- [11] M.J. Vesga, D. McKechnie, S. Laing, H. Kearns, K. Faulds, K. Johnston, J. Sefcik, Effect of glycine on aggregation of citrate-functionalised gold nanoparticles and SERS measurements, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 621 (2021) 126523. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126523>.
- [12] M.Y. Lin, H.M. Lindsay, D.A. Weitz, R.C. Ball, R. Klein, P. Meakin, Universality in colloid aggregation, *Nature.* 339 (1989) 360–362. <https://doi.org/10.1038/339360a0>.
- [13] R.F. Aroca Muñoz, M. Campos Vallete, J.V. García Ramos, Amplificación plasmónica de espectros Raman y de fluorescencia: SERS y SEF sobre nanoestructuras metálicas., n.d.
- [14] B.L. Darby, E.C. Le Ru, Competition between Molecular Adsorption and Diffusion: Dramatic Consequences for SERS in Colloidal Solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 10965–10973. <https://doi.org/10.1021/ja506361d>.
- [15] G. Fu, D.-W. Sun, H. Pu, Q. Wei, Fabrication of gold nanorods for SERS detection

- of thiabendazole in apple, *Talanta*. 195 (2019) 841–849.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.114>.
- [16] Merck, Folha de especificação - Thiabendazole, (n.d.).
<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/specification-sheet/SIAL/45684>.
- [17] N. Leopold, B. Lendl, A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *J. Phys. Chem. B*. 107 (2003) 5723–5727. <https://doi.org/10.1021/jp027460u>.
- [18] L.I. Espinosa-Vega, A. Belio-Manzano, C.A. Mercado-Ornelas, I.E. Cortes-Mestizo, V.H. Mendez-García, Aging spectral markers of tequila observed by Raman spectroscopy, *Eur. Food Res. Technol.* 245 (2019) 1031–1036.
<https://doi.org/10.1007/s00217-018-3203-4>.
- [19] C. Müller, L. David, V. Chiş, S.C. Pinzaru, Detection of thiabendazole applied on citrus fruits and bananas using surface enhanced Raman scattering, *Food Chem.* 145 (2014) 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.136>.
- [20] A.M. Tabanez, B.A. Nogueira, A. Milani, M.E.S. Eusébio, J.A. Paixão, H. Nur Kabuk, M. Jajuga, G.O. Ildiz, R. Fausto, Thiabendazole and Thiabendazole-Formic Acid Solvate: A Computational, Crystallographic, Spectroscopic and Thermal Study, *Molecules*. 25 (2020) 3083. <https://doi.org/10.3390/molecules25133083>.
- [21] M.-S. Kim, M.-K. Kim, C.-J. Lee, Y.-M. Jung, M.-S. Lee, Surface-enhanced Raman Spectroscopy of Benzimidazolic Fungicides: Benzimidazole and Thiabendazole, *Bull. Korean Chem. Soc.* 30 (2009) 2930–2934.
<https://doi.org/10.5012/bkcs.2009.30.12.2930>.
- [22] I.A. Brezestean, N. Tosa, A. Falamas, D. Cuibus, C.M. Muntean, A. Bende, B. Cozar, C. Berghian-Grosan, C. Farcău, Silver Nanoparticle Films Obtained by Convective Self-Assembly for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Analyses of the Pesticides Thiabendazole and Endosulfan, *Front. Chem.* 10 (2022).
<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.915337>.
- [23] E. Lopez-Tobar, M. Antalík, D. Jancura, M.V. Cañamares, A. García-Leis, D. Fedunova, G. Fabriciova, S. Sanchez-Cortes, Adsorption and Detection of Amyloid Marker Thioflavin T on Ag Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering, *J. Phys. Chem. C*. 117 (2013) 3996–4005. <https://doi.org/10.1021/jp310619c>.
- [24] E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 63 (2012) 65–87.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-032511-143757>.
- [25] A. Hussain, H. Pu, B. Hu, D.-W. Sun, Au@Ag-TGANPs based SERS for facile screening of thiabendazole and ferbam in liquid milk, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 245 (2021) 118908.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118908>.
- [26] Z. Chen, Y. Sun, J. Shi, W. Zhang, X. Zhang, X. Huang, X. Zou, Z. Li, R. Wei, Facile synthesis of Au@Ag core-shell nanorod with bimetallic synergistic effect for SERS detection of thiabendazole in fruit juice, *Food Chem.* 370 (2022) 131276.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131276>.
- [27] M.J.S. Oliveira, R.J.G. Rubira, L.N. Furini, A. Batagin-Neto, C.J.L. Constantino, Detection of thiabendazole fungicide/parasiticide by SERS: Quantitative analysis and adsorption mechanism, *Appl. Surf. Sci.* 517 (2020) 145786.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.145786>.
- [28] M. Muniz-Miranda, SERS investigation on five-membered heterocyclic compounds: isoxazole, oxazole and thiazole, *Vib. Spectrosc.* 19 (1999) 227–232.
[https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(98\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(98)00085-X).

- [29] M.E. Roca Jalil, M. Baschini, E. Rodríguez-Castellón, A. Infantes-Molina, K. Sapag, Effect of the Al/clay ratio on the thiabendazol removal by aluminum pillared clays, *Appl. Clay Sci.* 87 (2014) 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.014>.
- [30] L. Lin, T. Dong, P. Nie, F. Qu, Y. He, B. Chu, S. Xiao, Rapid Determination of Thiabendazole Pesticides in Rape by Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Sensors*. 18 (2018) 1082. <https://doi.org/10.3390/s18041082>.
- [31] R.L. McCreery, Raman Spectroscopy for Chemical Analysis, *Meas. Sci. Technol.* 12 (2001) 653–654. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/12/5/704>.
- [32] D.E. Brunetti B, About Estimating the Limit of Detection by the Signal to Noise Approach, *Pharm. Anal. Acta.* 06 (2015). <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000355>.
- [33] I. López-Tocón, J.C. Otero, J.F. Arenas, J. V Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, Multicomponent Direct Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Silver Nanoparticles Functionalized with the Viologen Host Lucigenin, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2518–2525. <https://doi.org/10.1021/ac102771w>.
- [34] S. Brunauer, L.S. Deming, W.E. Deming, E. Teller, On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases, *J. Am. Chem. Soc.* 62 (1940) 1723–1732. <https://doi.org/10.1021/ja01864a025>.
- [35] J.N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces: Third Edition*, 2011. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-05119-0>.
- [36] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309–319. <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>.
- [37] C.H. Giles, T.H. MacEwan, S.N. Nakhwa, D. Smith, 786. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids, *J. Chem. Soc.* 846 (1960) 3973. <https://doi.org/10.1039/jr9600003973>.
- [38] S. Sánchez-Cortés, J. V García-Ramos, G. Morcillo, Morphological Study of Metal Colloids Employed as Substrate in the SERS Spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 167 (1994) 428–436. <https://doi.org/10.1006/jcis.1994.1378>.
- [39] I. Ivanišević, S. Milardović, P. Kassal, M. Zlataar, Electrochemical and spectroscopic characterization of AgNP suspension stability influenced by strong inorganic acids, *Electrochim. Acta.* 377 (2021) 138126. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138126>.
- [40] Q. Chen, J. Zuo, X. He, X. Mo, P. Tong, L. Zhang, Enhanced fluorescence of terbium with thiabendazole and application in determining trace amounts of terbium and thiabendazole, *Talanta*. 162 (2017) 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.036>.
- [41] S. Ma, J. He, M. Guo, X. Sun, M. Zheng, Y. Wang, Ultrasensitive colorimetric detection of triazophos based on the aggregation of silver nanoparticles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 538 (2018) 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.11.030>.
- [42] V.-T. Hoang, N.X. Dinh, N. Le Nhat Trang, N.T. Khi, N. Van Quy, P.A. Tuan, D.Q. Tri, L.H. Thang, T.Q. Huy, A.-T. Le, Functionalized silver nanoparticles-based efficient colorimetric platform: Effects of surface capping agents on the sensing response of thiram pesticide in environmental water samples, *Mater. Res. Bull.* 139 (2021) 111278. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2021.111278>.
- [43] A. Stewart, S. Murray, S.E.J. Bell, Simple preparation of positively charged silver nanoparticles for detection of anions by surface-enhanced Raman spectroscopy,

- Analyst. 140 (2015) 2988–2994. <https://doi.org/10.1039/C4AN02305F>.
- [44] V.L. Albernaz, Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico, (2014) 121.
- [45] Zetasizer HR 3000, Biofutur. 1999 (1999) 54. [https://doi.org/10.1016/S0294-3506\(99\)80105-7](https://doi.org/10.1016/S0294-3506(99)80105-7).
- [46] D. Cunningham, R.E. Littleford, W.E. Smith, P.J. Lundahl, I. Khan, D.W. McComb, D. Graham, N. Laforest, Practical control of SERRS enhancement, *Faraday Discuss.* 132 (2006) 135–145. <https://doi.org/10.1039/B506241A>.
- [47] E. Detsri, P. Seeharaj, Colorimetric detection of glutathione based on phthalic acid assisted synthesis of silver nanoparticles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 533 (2017) 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.08.037>.
- [48] M.F. Alam, A.A. Laskar, S. Ahmed, M.A. Shaida, H. Younus, Colorimetric method for the detection of melamine using in-situ formed silver nanoparticles via tannic acid, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 183 (2017) 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.04.021>.
- [49] L. Rivas, A. Murza, S. Sánchez-Cortés, J. V. García-Ramos, Adsorption of acridine drugs on silver: Surface-enhanced resonance Raman evidence of the existence of different adsorption sites, *Vib. Spectrosc.* 25 (2001) 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(00\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(00)00101-6).
- [50] L. Guerrini, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, Self-assembly of a dithiocarbamate calix[4]arene on Ag nanoparticles and its application in the fabrication of surface-enhanced Raman scattering based nanosensors, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 1787. <https://doi.org/10.1039/b812811a>.
- [51] I. Matulaitiene, Z. Kuodis, O. Eicher-Lorka, G. Niaura, SERS characterization of imidazole ring terminated self-assembled monolayer formed from lipoic acid histamide on silver electrode, *J. Electroanal. Chem.* 700 (2013) 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.04.017>.
- [52] R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470035641>.
- [53] C.G. Blatchford, J.R. Campbell, J.A. Creighton, Plasma resonance - enhanced raman scattering by adsorbates on gold colloids: The effects of aggregation, *Surf. Sci. Lett.* 120 (1982) A339. [https://doi.org/10.1016/0167-2584\(82\)90060-3](https://doi.org/10.1016/0167-2584(82)90060-3).
- [54] O. Prakash, Excitation wavelength-dependent SERS and DFT study to probe Herzberg-Teller selection rules on charge-transfer effect, *J. Chem. Phys.* 153 (2020). <https://doi.org/10.1063/5.0022880>.