

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

LAÍS HENRIQUE PACHECO

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE
OURO DISPERSAS EM MATERIAL GRAXO E SUA APLICAÇÃO EM
ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE (SERS) PARA
AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS SULFURADAS**

Maceió – AL

2017

LAÍS HENRIQUE PACHECO

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE
OURO DISPERSAS EM MATERIAL GRAXO E SUA APLICAÇÃO EM
ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE (SERS) PARA
AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS SULFURADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Área Química Inorgânica, Linha de pesquisa Síntese e Aplicação de Nanoestruturas, da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Janaína Heberle Bortoluzzi

Maceió - AL

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- P116a Pacheco, Laís Henrique.
Desenvolvimento de um sistema contendo nanopartículas de ouro dispersos em material graxo e sua aplicação em espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS) para avaliação de moléculas orgânicas sulfuradas / Laís Henrique Pacheco. – 2017.
116 f.: il.
- Orientador: Mario Roberto Maneghetti.
Coorientadora: Janaína Heberle Bortoluzzi.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.
- Bibliografia: f. 104-116.
1. Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS). 2. Óleo de mamona. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Moléculas sulfuradas. I. Título.

CDU: 544.77



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

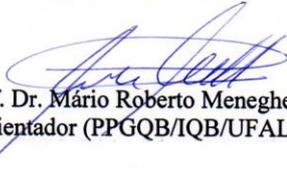


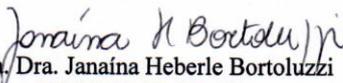
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

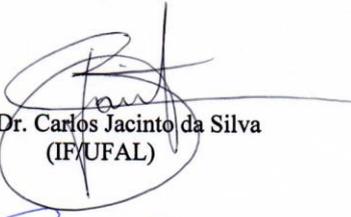
FOLHA DE APROVAÇÃO

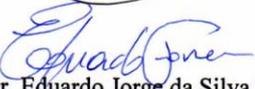
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Laís Henrique Pacheco** intitulada: **“Desenvolvimento de Um Sistema Contendo Nanopartículas de Ouro Dispersas em Material Graxo e sua Aplicação em Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS) para a Avaliação de Moléculas Orgânicas Sulfuradas.”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 07 de abril de 2017, às 09h00, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

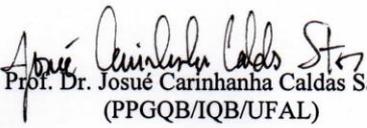
COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Mário Roberto Meneghetti
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Janaina Heberle Bortoluzzi
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Carlos Jacinto da Silva
(IF/UFAL)


Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca
(IF/UFAL)


Prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos
(PPGQB/IQB/UFAL)

À minha família,

Pois seu apoio tornou possível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha família pelo amor, incentivo e compreensão sempre que precisei, principalmente meus pais, **Maria Goretti** e **Anderson Pacheco**, e minha irmã, **Letícia Pacheco**;

Aos meus amigos e colegas que conheci ao longo do curso e também aos membros do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR), que nunca deixaram de acreditar no meu potencial, até mesmo quando eu não acreditava. Não poderia citar alguns, pois todos contribuíram de alguma forma para essa vitória;

Aos professores do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em especial os meus orientadores, Prof. **Mario Roberto Meneghetti** e Prof^a. **Janaína Heberle Bortoluzzi**, que me auxiliaram e transmitiram seus conhecimentos ao longo do curso com muita dedicação e paciência;

Aos colegas e professores do Laboratório de Materiais e Combustíveis da Universidade de Brasília, pela ajuda durante os períodos em que lá estive.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida a mim.

E, principalmente, a Deus que nunca deixou de me iluminar, proteger e me guiar nessa jornada.

RESUMO

Neste trabalho, foram utilizadas nanopartículas anisotrópicas de ouro (AuNPs), dispersas em óleo de mamona e imobilizadas em óleo de mamona hidrogenado, para a construção de um material para ser utilizado em Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (substrato SERS-ativo). As AuNPs sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível, onde foi possível a observação de um deslocamento da banda de absorção após a preparação do substrato, de 650 para 690 nm, e por Microscopia Eletrônica de Transmissão, as quais mostraram a obtenção de AuNPs na forma de estrelas com tamanho médio de 100 nm. Para a investigação de possíveis aplicações na área de SERS, o substrato obtido foi testado utilizando as moléculas sulfuradas: 4-aminotiofenol (4-ATP), benzotiofeno (BTF), tiofeno (TF), cisteamina e cisteína, como moléculas sonda de interesse. Os espectros SERS foram obtidos através da análise dos substratos após a imersão, por 24 h, em soluções com diferentes concentrações das moléculas sonda. Utilizando o 4-ATP como molécula sonda foi possível a obtenção de espectros SERS com uma faixa de concentração de $2,88 \times 10^{-2}$ até 1×10^{-10} mol L⁻¹, com o BTF e TF foi possível a ampliação de suas bandas Raman de 1×10^{-1} à 1×10^{-6} mol L⁻¹. Foram utilizadas também cisteamina e cisteína como moléculas sonda, porém com apenas uma concentração, 1×10^{-1} e 5×10^{-2} mol L⁻¹, respectivamente. Os resultados mostraram que o material desenvolvido possui sítios com atividade SERS, o que nos permitiu estudar sua interação com diferentes moléculas sonda, assim podendo ser aplicado em diversas áreas, tanto para análise qualitativa quanto quantitativa, mesmo para moléculas em soluções com concentrações muito pequenas. O substrato obtido apresentou EF da ordem de 10^2 a 10^3 .

Palavras-chave: SERS. Nanopartículas de ouro. Óleo de mamona. Moléculas sulfuradas.

ABSTRACT

In this study, we used anisotropic gold nanoparticles (AuNPs) dispersed in castor oil and immobilized in hydrogenated castor oil, for the construction of a material to be used in Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS-active substrate). The AuNPs synthesized were characterized by absorption spectroscopy in the Ultraviolet-visible region (UV-vis), where it was possible to observe a displacement of the absorption band after preparation of the substrate, from 650 to 690 nm, and by Transmission Electron Microscopy (TEM), which showed obtaining AuNPs with star shape and average size of 100 nm. To investigate the potential SERS applications, the obtained substrates were tested using the sulfur molecules of 4-aminothiophenol (4-ATP), benzothiophene (BTF), thiophene (TF), cysteamine and cysteine as probe molecules. The SERS spectra were obtained by analyzing the substrate after the immersion, for 24 h, in solutions with different concentrations of probe molecules. Using 4-ATP as a probe molecule it was possible to obtain SERS spectra with a concentration range of $2,88 \times 10^{-2}$ to 1×10^{-10} mol L⁻¹, with BTF and TF it was possible to increase its Raman bands from 1×10^{-1} to 1×10^{-6} mol L⁻¹. Cysteamine and cysteine were also used as probe molecules, but with only one concentration, 1×10^{-1} and 5×10^{-2} mol L⁻¹, respectively. The results showed that the developed material has interesting sites with SERS activity, allowing us to study its interaction with different probe molecules, so it can be applied to different areas, both in qualitative and quantitative analysis, even for molecules in solutions with very small concentrations. The obtained substrate presented EF of the order of 10^2 to 10^3 .

Keywords: SERS. Gold nanoparticles. Castor oil. Sulfur molecules.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Imagens de vitrais de Igrejas, na Alemanha e França, que foram produzidos utilizando nanopartículas metálicas durante a Idade Média. (b) Famoso Cálice de Licurgus produzido durante o império Romano, com (lado esquerdo) e sem (lado direito) a presença de luz em seu interior. -----	18
Figura 2: Modelo ilustrativo de um espalhamento Raman. ν_0 = frequência da radiação incidente; ν_m = frequências vibracionais da molécula. -----	26
Figura 3: Espectro Raman de CCl_4 excitado com laser de $\lambda_0 = 488 \text{ nm}$. ---	27
Figura 4: Esquema ilustrativo das diferenças entre espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes. -----	28
Figura 5: A polarização induzida (P) por um campo elétrico (E) na nuvem eletrônica de uma molécula, onde (α) representa a polarizabilidade da molécula. A dispersão pode ocorrer em várias direções, porém na figura só foram mostrados 90° e 180° . -----	29
Figura 6: Espectros de FT-IR de transmissão (superior) e Raman (inferior) de éster metílico de um ácido oleico. -----	32
Figura 7: Diagramas esquemáticos de instrumentações típicas usadas para a espectroscopia Raman. (a) Configuração Macro-Raman. (b) Configuração Micro-Raman. Abreviaturas: CCD, charge-coupled device; CL, lentes de coleção; FL, foco da lente; NF, filtro de interferência. -----	37
Figura 8: Representação da propagação de plásmons de superfície em (a) uma superfície metálica e (b) localizados em nanoesferas. -----	41
Figura 9: Diagrama ilustrativo do mecanismo de intensificação SERS através do modelo químico. -----	42
Figura 10: (a) Esquema de um processo em cinco etapas para a ligação molecular controlada de nanopartículas em um modelo microesferas montadas; (b) e (c) Imagens de MET da ligação entre duas microesferas. -	44
Figura 11: Imagens de MET de: (a) seção transversal e (b) vista superior de nanofendas produzidas por EUVL. -----	45
Figura 12: (a) Esquema do método de síntese para montagem regioespecífica de NP. (b) Imagens de MET de: (A) esferas montadas no fim dos nanobastões, (B) ao lado dos nanobastões e (C) ao redor de todo o nanobastão. (D) Análise estatística do número de AuNPs montadas através das diferentes rotas. -----	47

Figura 13: Imagens do sistema utilizado nas sínteses das nanopartículas de ouro. -----	50
Figura 14: Imagens das etapas de (a) lavagem e (b) secagem do produto da síntese. -----	51
Figura 15: Imagens das primeiras etapas para a produção do substrato. (a) Óleo de mamona hidrogenado fundindo; (b) e (c) adição do coloide; (d) mistura final. -----	52
Figura 16: Etapa final da preparação dos substratos. (a) forma de plástico; (b) substrato SERS-ativo pronto; (c) substrato branco (sem AuNPs) pronto. -----	53
Figura 17: Imagem de um Renishaw inVia Raman Microscope. -----	58
Figura 18: Imagem do sistema reacional após a adição do agente redutor. -----	60
Figura 19: Imagem da formação de uma película de nanopartículas de ouro na interface água/óleo após a reação: a) vista por baixo do balão de reação e b) vista por cima do balão de reação. -----	61
Figura 20: Espectros de Absorção no Ultravioleta-Visível do coloide e do substrato. -----	64
Figura 21: Imagens de MET do coloide obtido. -----	65
Figura 22: Espectros Raman dos materiais: substratos com e sem nanopartículas de ouro; coloide; óleo de mamona; e óleo de mamona hidrogenado. -----	66
Figura 23: Estrutura molecular dos ácidos (a) oleico, linoleico e ricinoleico, componentes do óleo de mamona e (b) estrutura geral de um triglicerídeo com as composições referentes ao óleo de mamona. -----	67
Figura 24: Espectros Raman obtidos dos substratos após imersão em solução de piridina 0,1 mol L ⁻¹ (Referência 54). -----	69
Figura 25: Espectros FT-Raman obtidos dos substratos com nanoestrelas de ouro (azul) após imersão em soluções de piridina com diferentes concentrações, substrato com nanoestrelas sem solução de piridina e substrato sem nanoestrelas (branco) com solução de piridina 1x10 ⁻³ mol L ⁻¹ . -----	70
Figura 26: Ilustração esquemática da transformação de 4-ATP em DMAB, nas formas cis e trans, na superfície do ouro durante as medidas de SERS. -----	72
Figura 27: Estrutura molecular do 4- aminotiofenol (4-ATP). -----	74

Figura 28: Espectro Raman do 4-ATP puro, onde (a) região de maior interesse em nosso estudo e (b) espectro completo. -----	75
Figura 29: Espectros Raman e SERS do 4-ATP. -----	76
Figura 30: Espectros Raman obtidos do substrato após imersão em soluções de 4-ATP com diferentes concentrações. -----	77
Figura 31: Gráfico da intensidade normalizada referente à soma das intensidades das bandas do 4-ATP em função de $-\log$ de sua concentração. -----	78
Figura 32: Gráfico da soma das áreas das bandas normalizadas do 4-ATP em função de $-\log$ de sua concentração. -----	79
Figura 33: Análise do mapeamento de área no substrato após imersão em solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 4-ATP (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b). -----	80
Figura 34: Espectros SERS do 4-ATP após diferentes tempos de imersão do substrato em uma solução com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ da molécula sonda. -----	81
Figura 35: Espectros SERS do 4-ATP após diferentes tempos entre a retirada do substrato da solução e a análise, em uma solução com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ da molécula sonda. -----	82
Figura 36: Estrutura molecular do benzotiofeno (BTF). -----	83
Figura 37: Espectro Raman do BTF puro. -----	83
Figura 38: Espectros Raman obtidos do substrato após imersão em soluções de BTF com diferentes concentrações (de 1×10^{-1} a $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e do substrato sem AuNPs após imersão em solução de BTF com concentração de $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. -----	84
Figura 39: Espectros Raman do substrato após imersão em soluções de BTF com as menores concentrações. -----	86
Figura 40: Gráfico da intensidade normalizada referente à soma das intensidades das bandas SERS do BTF em função de $-\log$ de sua concentração. -----	87
Figura 41: Gráfico da soma das áreas das bandas SERS normalizadas do BTF em função de $-\log$ de sua concentração. -----	87
Figura 42: Análise de mapeamento de área no substrato após imersão em solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de BTF (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b). -----	88

Figura 43: Estrutura molecular do Tiofeno (TF). -----	89
Figura 44: Espectro Raman do TF puro. -----	89
Figura 45: Espectros Raman do substrato após imersão em soluções de tiofeno com diferentes concentrações. -----	90
Figura 46: Espectros Raman do substrato após imersão em soluções de tiofeno com diferentes concentrações (CORTE). -----	91
Figura 47: Gráfico da intensidade normalizada referente à soma das intensidades normalizadas das bandas do tiofeno em função de $-\log$ de sua concentração. -----	92
Figura 48: Gráfico da soma das áreas das bandas normalizadas do TF em função de $-\log$ de sua concentração. -----	93
Figura 49: Análise do mapeamento de área no substrato após imersão em solução 1×10^{-3} mol L ⁻¹ de TF (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b). -----	94
Figura 50: Estrutura molecular da cisteamina. -----	94
Figura 51: Espectro Raman da cisteamina pura, onde (a) região de maior interesse nesse estudo e (b) espectro completo. -----	95
Figura 52: Espectros Raman obtidos dos substratos com e sem AuNPs após imersão em solução de cisteamina com concentração de 1×10^{-1} mol L ⁻¹ . -----	95
Figura 53: Estruturas possíveis das moléculas de cisteamina adsorvidas na superfície metálica: (a) conformação trans, (b) conformação gauche. Os termos trans e gauche descrevem a conformação do carbono próximo ao átomo de enxofre. -----	96
Figura 54: Análise do mapeamento de área no substrato após imersão em solução 1×10^{-1} mol L ⁻¹ de cisteamina (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b). -----	97
Figura 55: Estrutura molecular da cisteína. -----	98
Figura 56: Espectro Raman da cisteína pura, onde (a) região de maior interesse no nosso estudo e (b) espectro completo. -----	98
Figura 57: Espectros Raman obtidos dos substratos com e sem AuNPs após imersão em solução de cisteína com concentração de 5×10^{-2} mol L ⁻¹ . -----	99
Figura 58: Análise do mapeamento de área no substrato após imersão em solução 5×10^{-2} mol L ⁻¹ de cisteína (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b). -----	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Regiões espectrais e suas transições origem. -----	25
Tabela 2: Comparação entre Espectroscopia Raman e no Infravermelho Médio. -----	33
Tabela 3: Algumas fontes de <i>lasers</i> mais utilizadas na espectroscopia Raman. -----	34
Tabela 4: Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos espectros dos substratos com e sem nanopartículas e do coloide, relacionados principalmente à estrutura do ácido ricinoleico -----	68
Tabela 5: Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos os espectros Raman e SERS do 4-ATP. -----	78
Tabela 6: Atribuição sugerida para as principais bandas vibracionais nos espectros Raman e SERS do BTF. -----	85
Tabela 7: Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos espectros Raman e SERS do TF. -----	91
Tabela 8: Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos espectros Raman e SERS da cisteamina. -----	97
Tabela 9: Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos espectros Raman e SERS da cisteína. -----	99
Tabela 10: Fatores de Intensificação calculados para as moléculas sonda utilizadas. -----	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

4-ATP – 4-aminotiofenol

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ASTM – American Society for Testing and Materials – Sociedade Americana para Ensaio e Materiais

ATR – Attenuated Total Reflectance – Refletância Total Atenuada

AuNP – Nanopartícula de ouro

BTF – Benzotiofeno

CCD – Charge-coupled device – Dispositivo de carga acoplada

CL – - Lentes de coleção

DMAB – 4,4-dimercaptoazobenzene - 4,4-dimercaptoazobenzeno

e-beam – electron beam - feixe de elétrons

EF – Enhancement factor - Fator de intensificação

EM – Electromagnetic mechanism- Mecanismo eletromagnético

ESCA – Electron Spectroscopy for Chemical Analysis – Espectroscopia eletrônica para análise química

ESR – Electron spin resonance - Ressonância do Spin Eletrônico

EUVL – Extreme ultraviolet lithography - Litografia Ultravioleta Extrema

FL – Lens focus - Foco da lente

FIB – Focused ion beam - Feixe de íons focalizado

FT-IR – Fourier transform infrared spectroscopy – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

FT-Raman - Fourier transform Raman – Espectroscopia Raman por transformada de Fourier

HDS – Hidrodessulfurização

IP – Institute of Petroleum – Instituto do Petróleo

IR – Infrared - Infravermelho

Laser – Light amplification by stimulated emission of radiation – Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

LSPR – Localized Surface Plasmon Resonance – Ressonância de plásmon de superfície localizado

LUMO – Lowest unoccupied molecular orbital – Orbital molecular de mais baixa energia não ocupado por elétrons

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

Nd:YAG – neodymium-doped yttrium aluminum garnet - $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$

NF – Noise filter - Filtro de interferência

NIR – Near infrared - Infravermelho próximo

NP – Nanopartícula

NMR – Nuclear Magnetic Resonance - Ressonância Magnética Nuclear

PDA – Photodiode Array - Arranjos de fotodiodo

PEG – Polyethylene glycol - Polietilenoglicol

PEP – Polyetherimide - Polieterimida

PES – Photoemission Spectroscopy – Espectroscopia de fotoemissão

PIONs – Nanoporous ionic organic networks - Materiais orgânicos nanoporosos iônicos

PMTs – Photomultiplier tubes - Tubos fotomultiplicadores de contagens de fótons

SERRS – Surface Enhanced Resonance Raman Scattering – Espalhamento Raman Ressonante Intensificado por Superfície

SERS – Surface Enhanced Raman Spectroscopy – Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície

SPR – Surface Plasmon Resonance – Ressonância do plásmon de superfície

TF – Tiofeno

TOAB – Brometo de tetraoctilamônio

UV - Ultravioleta

UV-vis – Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Motivação	16
1.2 Objetivo geral	17
1.3 Objetivos específicos	17
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	18
2.1 Nanotecnologia	18
2.1.1 Introdução	18
2.1.2 Métodos de obtenção de nanopartículas	19
2.1.3 Aplicações de nanopartículas de ouro	22
2.2 Espectroscopia Raman	24
2.2.1 Breve histórico	24
2.2.2 Teoria da espectroscopia Raman	25
2.2.2.1 A origem do espectro Raman	26
2.2.2.2 Modelo ondulatório para os espalhamentos Raman e Rayleigh	29
2.2.3 Raman versus Infravermelho	31
2.2.4 Instrumentação	33
2.2.5 Aplicações	37
2.3 Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS)	39
2.3.1 Modelo Eletromagnético	40
2.3.2 Modelo Molecular	42
2.3.3 Substratos SERS-ativos	43
2.3.4 Fator de Intensificação SERS (EF)	46
2.3.5 Aplicações em SERS	47
3 PARTE EXPERIMENTAL	49
3.1 Síntese de nanopartículas de ouro	49
3.2 Preparação dos substratos SERS-ativos	51
3.3 Técnicas de Caracterização das Nanopartículas de Ouro	54
3.3.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)	54
3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	54
3.4 Testes dos substratos	55
3.4.1 4- Aminotiofenol (4-ATP) como molécula sonda	55
3.4.1.1 Estudo do tempo de imersão	56
3.4.1.2 Estudo do tempo de permanência da molécula sonda no substrato	56
3.4.2 Benzotiofeno (BTF) como molécula sonda	56
3.4.3 Tiofeno (TF) como molécula sonda	56
3.4.4 Cisteamina como molécula sonda	57
3.4.5 Cisteína como molécula sonda	57
3.5 Análises de espectroscopia Raman	57
3.6 Análise e tratamento de dados	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro	59
4.2 Preparação dos Substratos	62
4.3 Técnicas de Caracterização das Nanopartículas de Ouro	62
4.3.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)	63
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	64

4.4 Teste do Substrato	65
4.4.1 Escolha das moléculas sonda	71
4.4.1.1 4-Aminotiofenol (4-ATP)	71
4.4.1.2 Benzotiofeno (BTF) e Tiofeno (TF)	72
4.4.1.3 Cisteamina e Cisteína	74
4.4.2 As moléculas sonda	74
4.4.2.1 4-Aminotiofenol (4-ATP) como molécula sonda	74
4.4.2.1.1 Estudo do tempo de imersão	80
4.4.2.1.2 Estudo do tempo de permanência da molécula sonda no substrato	81
4.4.2.2 Benzotiofeno (BTF) como molécula sonda.	82
4.4.2.3 Tiofeno (TF) como molécula sonda.	88
4.4.2.4 Cisteamina como molécula sonda.	94
4.4.2.5 Cisteína como molécula sonda.	98
4.4.5 Fator de Intensificação SERS (EF)	100
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

Materiais nanoestruturados têm sido bastante estudados devido às suas propriedades, por exemplo (não só), ópticas e magnéticas, que são diferenciadas de seus correspondentes na forma mássica. Entre uma vasta gama de aplicações, uma delas vem sendo bastante investigada, que é a utilização de materiais nanoestruturados, de uma forma geral, na Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS), que utiliza superfícies metálicas rugosas nanoestruturadas para intensificação de sinais Raman de moléculas adsorvidas/ligadas à sua superfície em concentrações traço.

A técnica de SERS pode ser utilizada no estudo de propriedades vibracionais de moléculas, fornecendo informações estruturais, conformacionais e, até mesmo, sobre sua reatividade. Este fenômeno foi descoberto por Fleischmann e colaboradores após observarem que os sinais da Raman da piridina adsorvida em eletrodos de prata modificados foram significativamente intensificados. Desde então, vem sendo utilizada como uma importante ferramenta, pois ajuda a superar uma das limitações intrínsecas da Espectroscopia Raman, baixa intensidade dos sinais, causada devido à baixa seção de choque devido ao pequeno número de fótons espalhados, o que a tornaria uma técnica muito inferior as Espectroscopias no Infravermelho ou de Fluorescência (FLEISCHMANN, 1974; SANTANA et al., 2006; SILVA, 2011).

Atualmente, muitas estratégias têm sido desenvolvidas para a fabricação de materiais que possam apresentar atividade SERS, que são chamados de substratos SERS-ativo. No entanto, um dos principais desafios nas análises utilizando este efeito está na obtenção de substratos SERS-ativo estáveis e reprodutíveis, que simultaneamente promovam um consistente, reprodutível e alto fator de intensificação Raman (HUH, 2010).

Na busca para enfrentar este desafio, vários pesquisadores desenvolveram estratégias de fabricação para a obtenção de substratos com essas características, como utilização de nanopartículas revestidas, nanocascas metálicas, nanoanéis, nanoarames, entre outras (SANTANA et al., 2006; HUH, 2010). A produção de substratos SERS-ativo está geralmente baseada na obtenção de uma superfície metálica rugosa (SANTANA et al., 2006), ou estruturas ordenadas (periódicas), que sejam altamente reprodutíveis e estáveis. A partir disso, o efeito SERS vem sendo

estudado tanto na detecção de novas moléculas quanto na utilização de outros metais além da prata, como ouro e cobre (SILVA, 2011).

Então, o principal desafio deste trabalho foi o de propor um substrato SERS-ativo de fácil preparação para determinação de moléculas orgânicas sulfuradas, desenvolver um método de avaliação de suas propriedades SERS e propor possíveis aplicações para o mesmo.

1.2 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de uma estratégia para avaliar o efeito SERS de um substrato produzido a partir de nanopartículas de ouro imobilizadas em uma matriz orgânica de óleo de mamona/óleo de mamona hidrogenado, e avaliar sua interação com algumas moléculas sonda sulfuradas.

1.3 Objetivos específicos

- Preparação de um substrato SERS-ativo;
- Caracterização do material obtido através das técnicas de Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível, Raman e Microscopia Eletrônica de Transmissão;
- Testar a atividade em relação às moléculas sonda de benzotiofeno, tiofeno e 4-aminotiofenol em diferentes concentrações;
- Avaliar sua atividade em relação a duas moléculas sonda de interesse biológico: cisteamina e cisteína;
- Determinar o Fator de Intensificação SERS do substrato elaborado para todas as moléculas sonda utilizadas.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Nanotecnologia

2.1.1 Introdução

A saber, o prefixo “nano” é de origem grega e significa “anão”, de onde vem também a palavra “nanico” (TOMA, 2004).

A nanotecnologia vem se desenvolvendo desde a segunda metade do século XX, porém, ela é bem mais antiga que isso. Antes mesmo dessa tecnologia receber essa denominação, sabe-se que na Europa, durante a Idade Média, artesões eram capazes de elaborar vitrais de igrejas com um efeito multicolorido, pois elaboravam vidros contendo nanopartículas de ouro e de outros óxidos metálicos (Figura 1.a) (DE SOUZA, 2016). Durante o império Romano eram elaborados artefatos, como jarros de vidros com nanopartículas de ouro, por exemplo, o conhecido cálice de Lycurgus (Figura 1.b) (LONGO, 2004; DE SOUZA, 2016). Esses exemplos, já demonstravam o emprego das propriedades ópticas de nanomateriais, mesmo sem o conhecimento por parte dos artesãos da época.

Figura 1- (a) Imagens de vitrais de Igrejas, na Alemanha e França, que foram produzidos utilizando nanopartículas metálicas durante a Idade Média. (b) Famoso Cálice de Licurgus produzido durante o império Romano, com (lado esquerdo) e sem (lado direito) a presença de luz em seu interior.



Fonte: Adaptados de ANJOS, 2016; e G1, 2013.

Há indícios também de que os egípcios desenvolviam e utilizavam materiais nanoparticulados à base de chumbo na produção de maquiagens (DA SILVA, 2015), bem como, ouro em suspensão, o que chamavam de “elixir de ouro” que servia para estimular a mente e restaurar a juventude (DE SOUZA, 2016).

O marco inicial da nanotecnologia com maior caráter científico ocorreu após o discurso do famoso Físico norte-americano Richard Feynman que, em 1959, durante o encontro da American Physical Society, em sua palestra intitulada “Há muito espaço lá em baixo”, onde ele apresentou a ideia de manipular e controlar a matéria em uma escala extremamente pequena, construindo e moldando átomo a átomo. Feynman descreveu como os 24 volumes da Enciclopédia Britânica poderiam ser escritos na cabeça de um alfinete. Com isto, ele provocou seus colegas a explorar o imenso espaço contido nas profundezas da escala nanométrica (TOMA, 2004; WILLIAMS, 2006; CARVALHO, 2012; DA SILVA, 2015).

A partir deste momento, inspiraram-se centenas de pesquisas, gerando inúmeras descobertas e evoluindo a ciência por trás da nanotecnologia. E então, a nanotecnologia vem sendo explorada e aplicada em diversas áreas, tais como: biologia, medicina, meio ambiente, ciências dos materiais, eletrônica e sensores, energia, e muitas outras (WILLIAMS, 2006).

Na realidade, a nanotecnologia ainda está evoluindo de uma maneira que nos possibilitam sua utilização em objetos que vão desde computadores mais rápidos e menores a sensores moleculares e terapias específicas contra células cancerígenas. De fato, centenas de produtos no mercado já são de base nanotecnológica. A maioria destes produtos são o resultado da melhoria de tecnologias já estabelecidas, como materiais resistentes a riscos, revestimentos antiadesivos, entre outros (WILLIAMS, 2006).

A nanociência estuda os fenômenos e a manipulação de materiais em escalas atômicas e moleculares, que geram estruturas com propriedades (química, física, geométrica, quântica, entre outras) sensivelmente diferentes das observadas no mesmo material em maior escala, ao alcance dos nossos olhos ou de microscópios convencionais. A investigação científica no universo “nano” trabalha teoricamente em uma escala de 1 a 100 nanômetros (nm), e um nanômetro equivale a um milionésimo de milímetro ou a um bilionésimo de metro – 0,00000001 do metro (CARVALHO, 2012).

2.1.2 Métodos de Obtenção de Nanopartículas

Existem diversos métodos para a obtenção de materiais nanoestruturados, baseados em técnicas que utilizam processos físicos ou químicos. Essas técnicas

abordam basicamente duas estratégias: *botton up* (de baixo para cima) ou *top down* (de cima para baixo) (EDELSTEIN, 1998; DA SILVA, 2015).

As técnicas baseadas em metodologias *botton up* podem utilizar processos físicos ou químicos, em que são empregadas inicialmente unidades muito pequenas, moléculas individuais ou mesmo átomos como precursores, e estes são montados, em unidades de blocos de construção, gerando materiais com a dimensão nanométrica desejada. Normalmente as práticas baseadas nesse tipo de método empregam processos químicos por via úmida ou fase vapor (DA SILVA, 2009; DA SILVA, 2010; DA SILVA 2015).

Por outro lado, metodologias via *top down* geram nanopartículas a partir de partículas maiores, através do corte ou rompimento sucessivos de um material, como a cisão de estruturas microscópicas empregando-se laser como agente de rompimento das partículas. A sonólise e nanolitografia são alguns exemplos de técnicas baseadas nessa prática (DA SILVA, 2009; DA SILVA 2010).

Estratégias via *botton up*, como a síntese de partículas coloidais em fase líquida, a partir de soluções homogêneas, é especialmente interessante, pois as variáveis experimentais podem ser ajustadas, tais como: a concentração de reagentes, temperatura, pH (em soluções aquosas), presença de aditivos (tensoativos, sais, polímeros etc.), propriedades do solvente (temperatura de ebulição, afinidade com as superfícies criadas), adição de sementes de nucleação, entre outros. A influência destes fatores durante as etapas de formação das partículas direciona o tamanho e/ou morfologia final das partículas (MARTINS, 2012).

A formação de nanopartículas em solução compreende os processos de nucleação, crescimento e estabilização. A nucleação é uma etapa importante e fundamental, por ser o primeiro passo para o processo de cristalização, onde são formados os primeiros núcleos, a partir dos quais as nanopartículas irão crescer. O processo de crescimento é tão complexo quanto o de nucleação. Após a formação dos núcleos, verifica-se o crescimento por adição molecular, através de processos de difusão, além disso, as partículas podem crescer pela agregação de umas com as outras partículas presentes no meio (DA SILVA, 2010).

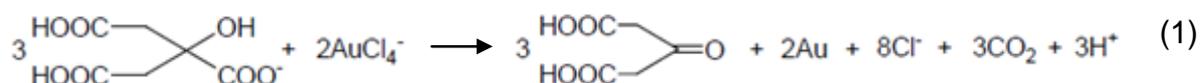
Devido à elevada energia de superfície em nanopartículas, *i.e.* são termodinamicamente instáveis se comparadas as suas formas mássicas, as mesmas tendem, naturalmente, a se aglomerar e crescer. Para evitar essa aglomeração ou crescimento descontrolado, duas estratégias podem ser utilizadas: repulsão por cargas

elétricas e adição de um agente estabilizante em torno das nanopartículas (DA SILVA, 2010).

Entre as nanopartículas metálicas, ouro e prata são sistemas bastante investigados. Os métodos convencionais de síntese de NPs de ouro baseiam-se na redução do correspondente sal de ouro(III), podendo obter-se coloides estáveis aquosos ou em meio orgânico (MARTINS, 2012).

Na literatura são encontradas diversas metodologias sintéticas para a preparação de nanopartículas de ouro com formas e tamanhos diferentes. O método mais comum foi introduzido por Turkevich (1951), utilizando soluções aquosas em que o íon citrato é agente redutor de espécies de ouro(III), tal como HAuCl_4 , atuando também como agente estabilizante por intermédio de repulsões eletrostáticas. A ligação do íon citrato à superfície da NP é relativamente fraca, o que é particularmente interessante quando se deseja, posteriormente, realizar reações de substituição destes agentes sobre a superfície. A introdução de agentes anfífilos, baseados em tióis, conjuntamente com o citrato, tem sido também apresentada com sucesso (MARTINS, 2012).

A equação que representa o processo reacional de redução do Au(III) para Au(0) em presença de citrato de sódio é mostrada na Equação 1 (DA SILVA, 2009).



Outro método de preparação de sistemas coloidais contendo AuNPs foi desenvolvido por Brust e colaboradores (1994 e 1995). Esse método leva a formação de coloides contendo AuNPs dispersas em meio orgânico, como, por exemplo o tolueno. A metodologia de Brust é baseada na dissolução de HAuCl_4 em água e subsequente transporte para tolueno por meio de um agente de transferência de fase, tal como brometo de tetraoctilamônio (TOAB). A solução de tolueno contendo os sais de Au(III) é então misturada com uma solução aquosa de boro-hidreto de sódio (NaBH_4 , agente redutor), em presença de sais de amônio de cadeia longa. Esses sais revestem as AuNPs formadas, evitando a aglomeração das mesmas. Cabe salientar, que, dependendo das quantidades relativas de Au e agente de transferência/proteção (sal de amônio) partículas esféricas de Au com diâmetro entre 1 e 10 nm podem ser obtidas (BRUST et al., 1994; BRUST et al., 1995; DA SILVA, 2009; DA SILVA, 2010).

A grande diferença entre os métodos de Turkevich (1951) e Brust (1994 e 1995) é a forma de estabilização das partículas coloidais obtidas. No processo empregando citrato, a aglomeração é impedida por uma dupla camada eletrônica e no caso do método bifásico esse impedimento ocorre por efeito estereoeletrônico (BRUST et al., 1994; BRUST et al., 1995; DA SILVA, 2009; DA SILVA, 2010).

Nosso grupo de pesquisa, buscando desenvolver métodos de síntese de AuNPs de forma simples, barata, controlada, empregando reagentes não tóxicos, para gerar sistemas coloidais não aquosos, híbridos orgânicos-inorgânicos, biocompatíveis e que permitissem ainda preparar NPs com diferentes características (tamanho e morfologia), apenas modificando as condições de reação, se desenvolveu um protocolo de síntese e estabilização de nanopartículas de ouro em óleo de mamona, adaptando os métodos de Turkevich (1951) e Brust (1994 e 1995) (MORAIS et al., 2013).

O resultado desta pesquisa gerou um coloide bastante estável, e nos baseando nas recentes aplicações para coloides, de acordo com a literatura, nos levou à estratégia de sua utilização em Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS), a qual será o tema a ser discutido neste trabalho.

2.1.3 Aplicações de Nanopartículas de ouro

Como mencionado anteriormente, as nanopartículas de ouro, nas suas mais variadas formas e tamanhos, vêm sendo utilizadas para diversas finalidades, tais como: sensores (DE BARROS, 2015; ZHANG et al., 2015; ROHIT et al., 2016); biossensores (CHEN et al., 2014; YUAN et al., 2014; PAULI et al., 2015; QIU et al., 2015); tratamento e diagnóstico de tumores (CHAUHAN, 2015; DA SILVA, 2015; ZHOU et al., 2015; BAMRUNGSAP et al., 2016; WANG, 2016); carreadores de fármacos (DOS SANTOS, 2013; LIANG et al., 2014; DEVI, 2015; ELBIALY, 2015); dispositivos ópticos e eletrônicos (XU et al., 2014; HOANG et al., 2015; JESURAJ, 2015; GONG et al., 2016); catálise (LANG, 2014; LI, 2014; MAYER et al., 2015; ZHANG et al., 2015); entre outros.

Rohit e colaboradores (2016) desenvolveram um método colorimétrico para detecção simples e sensível de organotiofosfatos usados em pesticidas em amostras de alimentos e águas ambientais utilizando ditiocarbamato de *p*-nitroanilina coberto por nanopartículas de ouro como sensor. O método baseava-se na mudança de cor do sensor de vermelho para azul com a presença de organotiofosfatos,

utilizando espectroscopia na região do UV-Vis, onde foi observado o deslocamento da banda referente à ressonância de plásmom de superfície das nanopartículas de ouro devido ao efeito de acoplamento das mesmas com o analito (ROHIT et al., 2016).

Nanopartículas de ouro também foram utilizadas para confecção de biossensor eletroquímico por Chen e colaboradores (2014). Ao contrário das estratégias convencionais, em que AuNPs são imobilizadas na superfície do eletrodo, eles prepararam nanopartículas coloidais e as adotaram diretamente como eletrólito. Assim, conseguiram obter uma sensível detecção de glicose, com baixo limite de detecção, menor até do que o método colorimétrico usualmente utilizado (CHEN et al., 2014).

Nanopartículas de ouro coloidais, na biomedicina, são bons candidatos a nanocarreadores e entrega de drogas. A maioria dos trabalhos, utilizando nanopartículas de ouro como carreadores de fármacos, está preocupada com o tratamento de câncer. Através de direcionamentos passivos e ativos, a concentração de drogas pode ser aumentada no local do tumor, limitando a exposição de tecido saudável. Além disso, a conjugação de ciclodextrinas, polietilenoglicol (PEG) ou polieterimida (PEP) aos conjuntos de ouro-carga melhora a biodistribuição e suprime a toxicidade. As AuNPs são também utilizadas para a entrega intracelular ou *in vivo* de agentes de contraste, fotossensíveis, drogas antibacterianas e drogas anticâncer (LIANG et al., 2014).

Zhang et. al. (2015) apresentaram um material obtido através da polimerização de materiais orgânicos nanoporosos iônicos (PIONs). Devido ao efeito eletrostático e estérico, essas redes iônicas com canais nanoporosos podem ancorar e estabilizar AuNPs de 1-2 nm. O material híbrido Au@PION foi usado como catalisador heterogêneo na oxidação aeróbica de alcoóis saturados, onde proporcionou excelente desempenho, com alta atividade, seletividade e estabilidade (ZHANG et al., 2015).

Outra aplicação que vem chamando também muito a atenção dos pesquisadores é a utilização de AuNPs em Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS), uma vez que podem se tornar substratos que produzem grande intensificação, assim como NPs de prata e cobre (FARIA, 1999). Então, a aplicação de AuNPs em SERS trata-se do objetivo principal do nosso trabalho e, por isso, será melhor discutida nas próximas seções.

2.2 Espectroscopia Raman

2.2.1 Breve histórico

O estudo sobre espectroscopia Raman teve início em 1928, quando o físico Chandrasekhara Venkata Raman observou um efeito previsto inicialmente por Adolf Smekal em 1923. Raman, utilizando a luz solar como fonte de radiação, um telescópio como coletor e seus olhos como detector, demonstrou que o comprimento de onda, na região do visível, de uma pequena fração de radiação espalhada por determinadas moléculas era diferente do feixe incidente, com frequências maiores e menores, e que os deslocamentos desse comprimento de onda dependiam da estrutura química das moléculas responsáveis pelo espalhamento. Raman foi agraciado com Prêmio Nobel de Física em 1931 por este trabalho (SINGH, 2002; FERRARO, 2003; SKOOG, 2007).

A partir daí, gradualmente ocorreram melhorias na parte instrumental da espectroscopia Raman. As primeiras pesquisas foram concentradas na tentativa de produzir fontes de excitação mais efetivas, iniciando com o desenvolvimento de lâmpadas compostas por vários elementos, até a produção das fontes *lasers*, em 1962, por Theodore Maiman e colaboradores (1961). Em 1963, Kogelnik e Porto (brasileiro) obtiveram os primeiros espectros Raman utilizando *lasers*. Nesse período, ocorreram progressos também nos sistemas de detecção, considerando que inicialmente, até a Segunda Guerra Mundial, as medidas eram feitas utilizando placas fotográficas, e posteriormente a detecção fotoelétrica passou a ser utilizada nesta técnica (FERRARO, 2003; SALA, 2008).

O desenvolvimento da parte óptica dos instrumentos Raman tomou lugar de destaque nos anos 60, com a evolução dos monocromadores (seletores de comprimentos de onda). Atualmente, estão sendo bastante utilizados detectores multicanais, que empregam, monitoramento simultâneo em vários comprimentos de onda, como os sensores CCD, Dispositivo de Carga Acoplada (*Charge Coupled Device*) (RAIMUNDO, 1997; FERRARO, 2003; SALA, 2008).

Os avanços na tecnologia da instrumentação dos espectrômetros Raman têm levado esta técnica a uma posição de destaque dentre as disponíveis para aplicações em problemas de interesse químico. Além dos exemplos citados anteriormente, podemos destacar o uso de microscópio óptico acoplado ao espectrômetro (SANT'ANA, 2006), que foi introduzido por volta dos anos 70, passando a se chamar microscopia ou microespectroscopia Raman (Raman

microprobe) (KANO et al., 2014) e o desenvolvimento de equipamentos de baixo custo, com laser de estado sólido e fibra óptica para transporte da luz incidente e espalhada (SANT'ANA, 2006).

Estas transformações e melhorias na área instrumental para medidas espectroscópicas Raman continuaram a ocorrer. Espectros Raman podem ser obtidos também por transformada de Fourier (FT-Raman). Além disso, é possível encontrar instrumentos acoplados a Espectrômetros de Infravermelho (FT-IR), abrindo novas possibilidades no estudo do efeito Raman (FERRARO, 2003; SALA, 2008).

2.2.2 Teoria da espectroscopia Raman

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Dependendo dos tipos de níveis energéticos envolvidos (eletrônicos, vibracionais ou rotacionais), as transições podem ocorrer em regiões diferentes do espectro eletromagnético como, por exemplo: na região do UV-vis, do infravermelho/Raman ou na região de micro-ondas (SALA, 2008).

A Tabela 1 mostra alguns tipos de espectroscopia, suas regiões espectrais e suas transições eletrônicas de origem.

Tabela 1- Regiões espectrais e suas transições de origem.

Espectroscopia	Região ($\tilde{\nu}$, cm^{-1})	Origem
Raio γ	$10^{10} - 10^8$	Rearranjo das partículas elementares no núcleo
Raio X (ESCA, PES)	$10^8 - 10^6$	Transições de níveis de energia dos elétrons internos de átomos e moléculas
UV-Visível	$10^6 - 10^4$	Transições de níveis de energia dos elétrons de valência de átomos e moléculas
Raman e Infravermelho	$10^4 - 10^2$	Transições entre níveis vibracionais (mudança de configuração)
Microondas	$10^2 - 1$	Transições entre níveis rotacionais (mudança de orientação)
Ressonância do Spin Eletrônico (ESR)	$1 - 10^{-2}$	Transição entre os níveis de spin eletrônico em um campo magnético
Ressonância Magnética Nuclear (NMR)	$10^{-2} - 10^{-4}$	Transição entre os níveis de spin nuclear em um campo magnético

Fonte: Adaptada de FERRARO (2003).

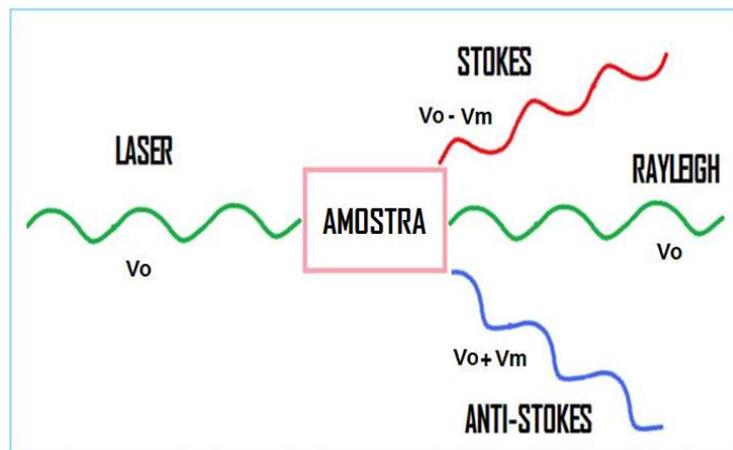
2.2.2.1 A origem do espectro Raman

Os espectros Raman são obtidos a partir da irradiação sobre a amostra com uma potente fonte de radiação monocromática (e.g., *laser*) na região do visível ou IR – próximo. A radiação eletromagnética poderá interagir com a amostra de duas maneiras: i) a maior parte será espalhada elasticamente, quando não há mudança na frequência do fóton incidente, e ii) uma pequena parte será espalhada inelasticamente (em torno de 0,001% da radiação incidente), quando ocorre a mudança na sua frequência inicial (SKOOG, 2007).

A radiação espalhada com a mesma frequência da fonte, ou seja, sem ocorrer mudanças nos níveis de energia vibracional e/ou rotacional da molécula, é chamada de espalhamento Rayleigh (SKOOG, 2007; FATOBENE, 2008).

A Figura 2 mostra um modelo ilustrativo da interação da radiação de excitação com frequência ν_0 , e seus espalhamentos resultantes: Stokes, Rayleigh e anti-Stokes, com frequências $\nu_0 - \nu_m$, ν_0 , $\nu_0 + \nu_m$, respectivamente. Onde ν_m representa uma das frequências vibracionais da amostra.

Figura 2- Modelo ilustrativo de um espalhamento Raman. ν_0 = frequência da radiação incidente; ν_m = frequências vibracionais da molécula.

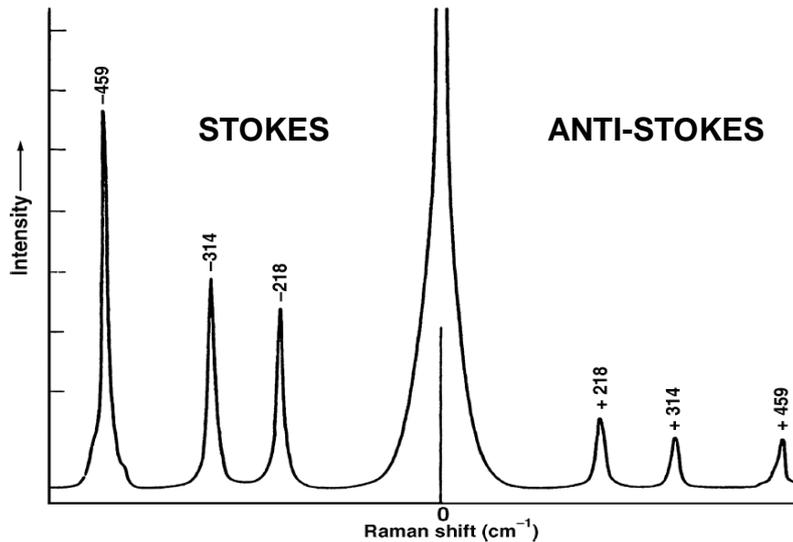


Fonte: PACHECO (2012)

Em um espectro Raman poderá ser observado, simetricamente em relação à linha Rayleigh, as bandas Stokes, do lado das frequências mais baixas, e as anti-Stokes, do lado das frequências mais altas. Uma vez que ambos fornecem as mesmas informações, geralmente é medido apenas o lado Stokes do espectro (FERRARO, 2003). Essas bandas deveriam ter a mesma intensidade, mas não é o

que acontece. Observa-se que as bandas Stokes são mais intensas do que as anti-Stokes (FERRARO, 2003; SALA, 2008). Este comportamento está mostrado na Figura 3, com o espectro do tetracloreto de carbono, CCl_4 .

Figura 3- Espectro Raman de CCl_4 excitado com laser em $\lambda_0 = 488 \text{ nm}$.



Fonte: Adaptada de NAKAMOTO (2009).

Como a fluorescência pode interferir seriamente na região Stokes do espectro, os sinais anti-Stokes, mesmo com menores intensidades, podem ser mais úteis nesses casos (SKOOG, 2007).

A diferença entre as intensidades Raman Stokes e anti-Stokes pode ser explicada analisando-se o modelo quântico, o qual descreve que no espalhamento Raman Stokes, a molécula é excitada ao colidir com o fóton incidente e passa para um estado de maior energia, chamado estado virtual, pois é um estado intermediário e não um estado estacionário da molécula. Em seguida, ela decai a um nível vibracional excitado, com espalhamento de luz de menor energia. A diferença entre a energia do fóton incidente e a do fóton espalhado é igual a uma das energias vibracionais da molécula. No espalhamento Rayleigh, a interação ocorre sem modificações na frequência inicial, pois a molécula volta ao mesmo nível de energia inicial (BARBOSA, 2003; SALA, 2008).

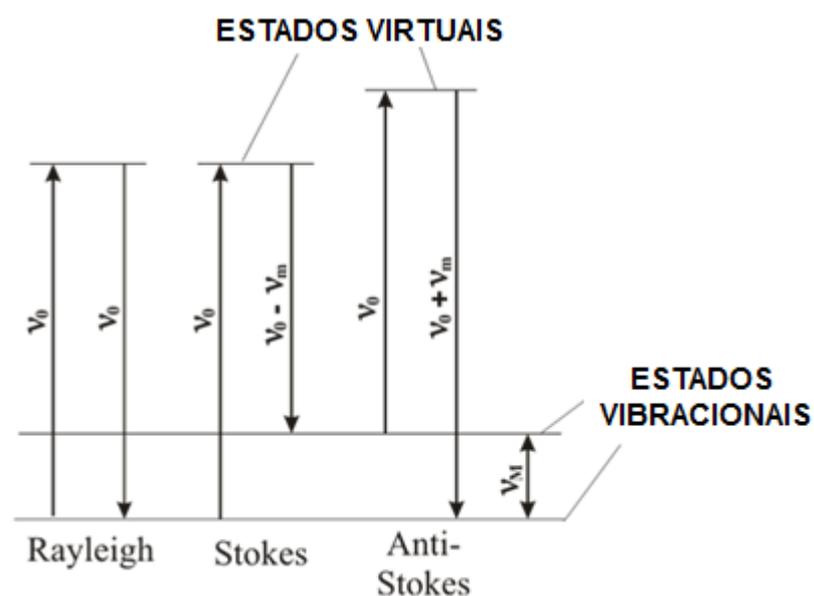
Para que o espalhamento Raman anti-Stokes ocorra é necessário que um elétron se encontre em um nível vibracional de maior energia, o que depende da temperatura. Assim, o fóton encontra a molécula já em um estado excitado e, após a interação, volta ao estado fundamental, gerando um fóton com energia maior que a

inicial (BARBOSA, 2003; SALA, 2008). Levando em conta que a ocupação dos níveis vibracionais nas moléculas segue a equação de distribuição de Boltzmann, que indica que poucas moléculas estão em seu estado vibracional ou rotacional excitados, isso normalmente a temperatura ambiente (BAKER, 2005), faz com que o espalhamento Raman anti-Stokes seja mais fraco que outros. Assim, a emissão Stokes é mais favorecida em relação à anti-Stokes. Além disso, o espalhamento Rayleigh tem uma maior probabilidade em ocorrer, que o espalhamento Raman, uma vez que é mais provável a transferência de energia para moléculas no estado fundamental seguido do espalhamento pelo retorno destas moléculas ao mesmo estado (SKOOG, 2007).

Uma vez que os níveis vibracionais seguem as regras quânticas, a variação de energia que ocorre com o efeito Raman também é quantizada, assim, observam-se discretos deslocamentos das frequências e, conseqüentemente, deslocamentos dos comprimentos de onda (EWING, 1972).

A Figura 4 ilustra o que foi discutido anteriormente, onde pode ser observada a diferença entre espalhamento Rayleigh (elástico) e espalhamento Raman (inelástico). Podemos observar também que a diferença de energia em ambos os espalhamentos, Stokes e anti-Stokes é igual à energia de um estado vibracional.

Figura 4- Esquema ilustrativo das diferenças entre espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes.



Fonte: Adaptado de BARBOSA (2003).

Além disso, a radiação pode interagir com a matéria de outras maneiras, dando início a uma série de excitações elementares, como: os polárítos, as ondas de spin, os plásmos, que são restritos a classes especiais de materiais, etc. Uma excitação elementar que está presente em qualquer tipo de material para temperatura acima do zero absoluto, são os fônons (FERREIRA, 2008). Esses tipos de interação não serão discutidos neste trabalho.

2.2.2.2 Modelo ondulatório para os espalhamentos Raman e Rayleigh

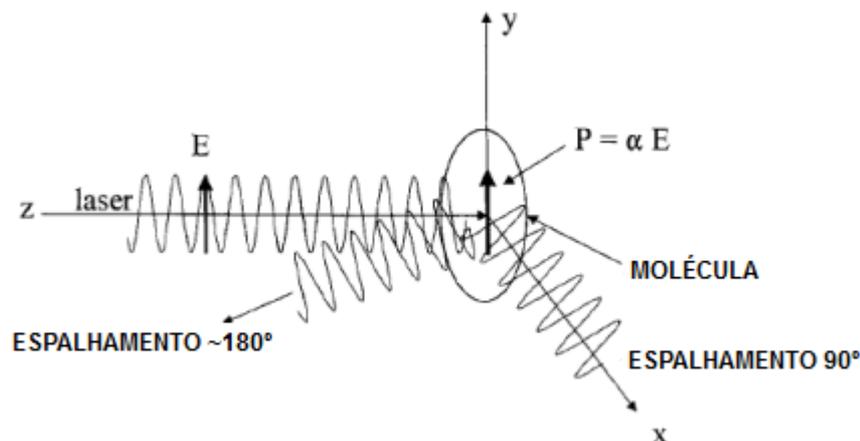
O efeito Raman pode também ser compreendido através do modelo ondulatório. A descrição clássica do efeito Raman, mostrado na Figura 5, está ligada à variação do momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico oscilante da radiação incidente (McCREERY, 2000).

O momento de dipolo induzido (P) está relacionado com a polarizabilidade da molécula (α) e com o campo elétrico incidente (E) de acordo com a seguinte equação:

$$P = \alpha E \quad (2),$$

onde α mede a facilidade que a nuvem eletrônica tem para se deformar e originar o dipolo (McCREERY, 2000; FERREIRA, 2008).

Figura 5- A polarização induzida (P) por um campo elétrico (E) na nuvem eletrônica de uma molécula, onde (α) representa a polarizabilidade da molécula. A dispersão pode ocorrer em várias direções, porém na figura só foram mostrados 90° e 180°.



Fonte: Adaptado de McCREERY (2000).

De acordo com a teoria clássica, a intensidade do campo elétrico (E) produzido pelo *laser* oscila com o tempo, como é mostrado na equação abaixo (FERRARO, 2003):

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (3)$$

Onde E_0 é a amplitude da vibração e ν_0 é a frequência do *laser*. Se uma molécula diatômica é irradiada por essa luz, e um momento de dipolo elétrico (P) é induzido, então (FERRARO, 2003):

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (4)$$

Se uma molécula está vibrando com frequência ν_m , o deslocamento nuclear (q) será escrito como (FERRARO, 2003):

$$q = q_0 \cos 2\pi\nu_m t \quad (5)$$

Onde q_0 é a amplitude vibracional.

A polarizabilidade varia com as vibrações do sistema e pode ser expressa por uma série de Taylor dada por (FERREIRA, 2008; SALA, 2008):

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \dots \quad (6)$$

Onde os termos de ordem mais alta são desprezados devido à pequena variação da coordenada q (SALA, 2008), α_0 é a polarizabilidade na posição de equilíbrio, $\frac{d\alpha}{dq}$ é a taxa de mudança de α em relação à mudança de q , avaliados na posição de equilíbrio (FERRARO, 2003).

Combinando as equações (4), (5) e (6), temos:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_m t) \quad (7)$$

Fazendo as manipulações trigonométricas necessárias na equação (7), teremos:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \{\cos[2\pi(\nu_0 + \nu_m)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_m)t]\} \quad (8)$$

De acordo com a equação (8) o primeiro termo dá origem ao espalhamento elástico da luz (Rayleigh), já que este só depende da frequência ν_0 . O segundo termo pode ser relacionado ao aparecimento dos espalhamentos Raman Stokes e Anti-Stokes, porém isto só ocorrerá se houver necessariamente a variação da polarizabilidade elétrica do material devido a um deslocamento da coordenada q . (FERREIRA, 2008), isto é:

$$\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 \neq 0 \quad (9)$$

Outra observação que pode ser feita na equação (8) é que as frequências $(\nu_o - \nu_m)$ e $(\nu_o + \nu_m)$ estão diretamente relacionadas às frequências dos espalhamentos Raman Stokes e Anti-Stokes, respectivamente (FERREIRA, 2008).

2.2.3 Raman versus Infravermelho

Como já discutido anteriormente, as transições vibracionais podem ser observadas tanto no efeito Raman como na absorção no infravermelho, mas nem todas as transições possíveis são observadas em ambos (EWING, 1972).

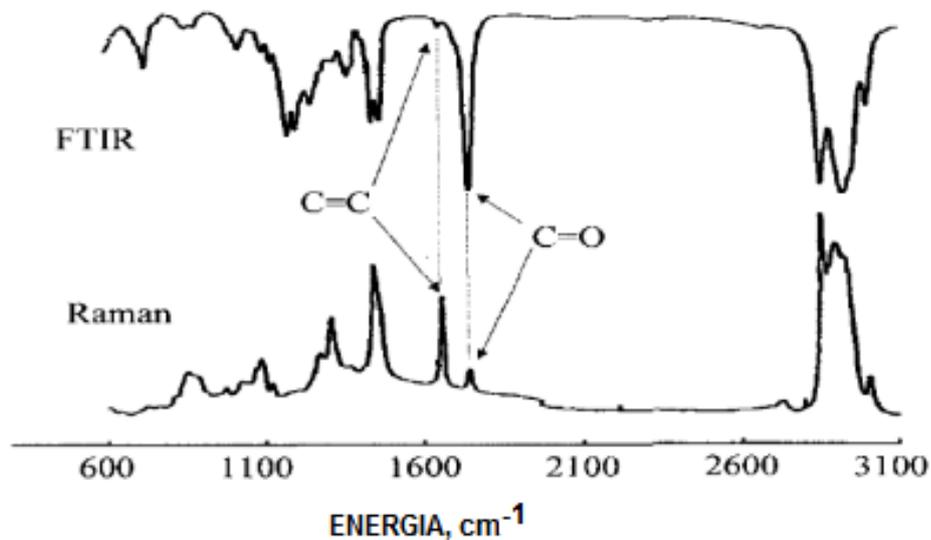
Apesar da grande semelhança entre os espectros de Infravermelho e Raman, ambos originados dos modos vibracionais das moléculas (SKOOG, 2007; FERNANDES, 2010), eles são obtidos através de fenômenos fisicamente diferentes (SALA, 2008; NAKAMOTO, 2009). O espectro Raman é obtido pelo espalhamento da luz incidente pela amostra e o espectro Infravermelho é obtido quando fótons na região do infravermelho são absorvidos pelas moléculas, promovendo transições entre os níveis vibracionais da molécula no seu estado eletrônico fundamental (NAKAMOTO, 2009).

Em razão dessas diferenças em seus mecanismos básicos, as regras de seleção também serão diferentes em cada técnica, existindo tipos de grupos que são ativos somente no infravermelho ou somente no Raman, ou ainda podem ser ativos nas duas técnicas, tornando-as complementares e não competitivas (SKOOG, 2007).

Apenas os grupos cuja polarizabilidade varia em função das vibrações serão ativos no Raman, enquanto que para ser ativo no infravermelho é preciso uma mudança no momento de dipolo durante a absorção (McCREERY, 2000).

Mostramos um exemplo na Figura 6, onde temos espectros de infravermelho (superior) e Raman (inferior) do ácido oleico.

Figura 6- Espectros de FT-IR de transmissão (superior) e Raman (inferior) do éster metílico do ácido oleico.



Fonte: Adaptado de McCREERY (2000).

Na Figura 6, podemos observar diferenças nas intensidades de duas bandas, referentes ao estiramento das ligações C=C e C=O. A polarizabilidade da ligação C=C muda significativamente com uma vibração associada ao estiramento da ligação C=C. Assim, o espalhamento Raman a partir de uma ligação C=C é forte, enquanto que em relação a uma ligação C=O é relativamente fraca. Em contraste, a absorção no Infravermelho do mesmo modo vibracional da ligação C=C é muito fraca e da ligação C=O é forte (McCREERY, 2000). Assim, para o estudo de estruturas moleculares ambas as técnicas podem ser usadas, dependendo do objetivo de cada pesquisa e da disponibilidade dos equipamentos, existindo vantagens e desvantagens na utilização de cada técnica.

A Tabela 2 mostra algumas comparações entre as técnicas de espectroscopia Raman e FT-IR médio.

Tabela 2- Comparação entre Espectroscopia Raman e no Infravermelho Médio.

	Espectroscopia Raman	Infravermelho (Médio)
Fenômeno	Espalhamento	Absorção
Informação	Bandas de vibrações fundamentais (região de impressão digital). Sem problemas com baixos números de onda.	Bandas de vibrações fundamentais (região de impressão digital)
Tipo de amostra analisada	Orgânicas, inorgânicas, metálicas, biológicas etc.	Orgânicas, inorgânicas e metálicas.
Preparação de amostra	Nenhuma.	Geralmente, usa-se pastilha de KBr. Com exceção à técnica de ATR.
Estado físico da amostra	Sólido, líquido, gel, suspensão etc.	Amostras sólidas precisam ser compactadas em pastilha de KBr.
Material de vidro	Sem interferência.	Interferência do vidro.
Água	Podem ser analisadas soluções aquosas.	Interferência da água.
Amostragem remota	Até 200 metros.	Não é possível, a luz IR é perdida em fibra óptica.

Fonte: Adaptada de FATOBENE (2008).

2.2.4 Instrumentação

Um sistema de espectroscopia Raman possui quatro componentes principais: i) fonte de excitação (*laser*), ii) sistema de amostragem e coleta de luz, iii) seletor de comprimento de onda (filtro ou monocromador) e iv) detector (arranjo de diodos, CCD ou tubos fotomultiplicadores, PMTs) (PRINCETON INSTRUMENTS, 2016).

- *Lasers*

Em um *Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)*, ocorre emissão estimulada de fótons através da excitação de determinado material para um nível maior de energia seguida da sua volta a um estado de menor energia. Então, o fóton liberado estimula a emissão de outros fótons, num efeito cascata, se tornando um meio amplificador. Assim, essas “partículas” apresentam o mesmo comportamento e se propagam em uma mesma direção, surgindo o feixe laser, que

é concentrado, monocromático e bastante intenso (BAGNATO, 2001; SKOOG, 2006; MARTINS; 2008).

Por essa capacidade de amplificação de intensidade, os *lasers* tornaram-se uma ferramenta importante para a espectroscopia Raman, uma vez que a utilização de fontes de luz com muita intensidade é necessária, já que a fração da luz que sofre efeito Raman é mínima. Aumentando-se a intensidade da fonte de excitação, aumenta-se também a intensidade da luz espalhada, conseqüentemente, a sensibilidade da técnica também será incrementada (SOUZA, 2009).

Na espectroscopia Raman a amostra é normalmente iluminada por um feixe de *laser* na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) ou faixa do infravermelho próximo (NIR) (PRINCETON INSTRUMENTS, 2016). Os primeiros *lasers* comerciais começaram a aparecer na década de 70. Na mesma época, o brasileiro Sergio Porto (1963) publicou a obtenção do primeiro espectro Raman excitado por *laser*. Porém, apenas na década de 80, com o uso da excitação com *laser* no infravermelho próximo, o que virtualmente elimina a limitação vista em amostras fluorescentes, a espectroscopia Raman ficou caracterizada por sua aplicação quase universal (SOUZA, 2009; LEM, 2016).

Existem *lasers* de vários comprimentos de onda utilizados na espectroscopia Raman, e sua escolha irá depender do tipo de amostra a ser analisada e também de que tipo de resultado espera-se obter, uma vez que os *lasers* com baixos comprimentos de onda e altas intensidades podem ocasionar a fluorescência de determinadas amostras.

Os cinco *lasers* mais comuns utilizados na espectroscopia Raman estão listados na Tabela 3, a seguir.

Tabela 3- Algumas fontes *lasers* mais utilizadas na espectroscopia Raman.

Tipo de Fonte	Comprimento de onda (nm)
Íon argônio	488,0 ou 515,5
Íon criptônio	530,9 ou 647,1
Hélio/Neônio	632,8
<i>Laser</i> de diodo	782 ou 830
Nd:YAG*	1 064

Fonte: SKOOG (2007).

Nota: * neodymium-doped yttrium aluminum garnet; Nd:Y₃Al₅O₁₂

- Amostragem e coleta de luz

O sistema de amostragem para a espectroscopia é muito simples uma vez que não é necessária a preparação da amostra e a mesma pode ser sólida, líquida ou gasosa. A amostragem pode ser feita com materiais de vidro, como cubetas, placas de vidro, ou através de fibra óptica, neste último podendo chegar a uma distância maior do que 100 metros entre a fonte e a amostra (SKOOG, 2007).

A luz dispersa, após a passagem do *laser* pela amostra, é coletada com uma lente e enviada para o filtro de interferência ou para o monocromador para a obtenção do seu respectivo espectro Raman (PRINCETON INSTRUMENTS, 2016).

O acoplamento de um microscópio ao espectrômetro Raman, chamado de microscopia Raman, como já mencionado, nos fornece um elemento de resolução espacial, o que nos permite a obtenção de espectros de alta qualidade de regiões microscópicas da amostra sem perder a sensibilidade e flexibilidade da técnica e, neste tipo de equipamento, o *laser* é focalizado na amostra e coletado pela mesma lente objetiva do microscópio (STILES et al., 2008; SOUZA, 2009).

- Seletores de comprimento de onda e filtros de interferência

Uma vez que o espalhamento Raman espontâneo é muito fraco, a principal dificuldade da espectroscopia Raman era separá-lo da intensidade do espalhamento Rayleigh, que é muito intenso. O grande problema não é o espalhamento Rayleigh em si, mas o fato da intensidade da luz difusa do espalhamento Rayleigh poder exceder em muito a intensidade Raman útil nas proximidades do comprimento de onda do *laser* (McCREERY, 2000; PRINCETON INSTRUMENTS, 2016).

Em muitos casos, o problema pode ser resolvido simplesmente cortando-se a faixa espectral próxima à linha do *laser*, onde a luz difusa tem o efeito mais notável, usando um filtro de interferência disponível comercialmente, que corta a faixa espectral de mais ou menos 80 a 120 cm^{-1} a partir da linha do *laser*. Este método é eficiente na eliminação de luz difusa, mas não permite a detecção dos modos Raman de baixa frequência, ou seja, na faixa abaixo de 100 cm^{-1} (McCREERY, 2000).

A partir do desenvolvimento de filtros de interferência holográficos, que possuem elevado desempenho, passou-se a utilizar os monocromadores simples de uma forma eficaz. Os filtros holográficos eliminam a maior parte da luz dispersa elasticamente (Rayleigh) (UFSC, 2006).

Outra forma de reduzir a luz dispersa é usando múltiplos estágios de dispersão. Duplos ou triplos monocromadores permitem a obtenção de espectros sem o uso de filtros de interferência. Em tais sistemas, os modos Raman-ativos com frequências baixas, como $3\text{-}5\text{ cm}^{-1}$ podem ser eficientemente detectados (PRINCETON INSTRUMENTS, 2016).

- Detectores

Inicialmente usava-se principalmente um único ponto de detectores, tais como tubos fotomultiplicadores de contagem de fótons (PMT). No entanto, para a obtenção de um único espectro Raman com um detector PMT, no modo de varredura, era necessário um enorme período de tempo, o que poderia prejudicar uma atividade de investigação ou não seria viável industrialmente como técnica analítica (PRINCETON INSTRUMENTS, 2016).

Atualmente, cada vez mais pesquisadores utilizam detectores multicanais, que monitoram simultaneamente vários comprimentos de onda, podendo ser dispersivos ou não dispersivos, os quais utilizam redes de difração ou diodos emissores de luz, respectivamente. Podemos citar como detectores multicanais para detectar a luz Raman espalhada: arranjos de fotodiodo (PDA) ou, mais comumente, um dispositivo de carga acoplada (CCD) (RAIMUNDO, 1997; PRINCETON INSTRUMENTS, 2016).

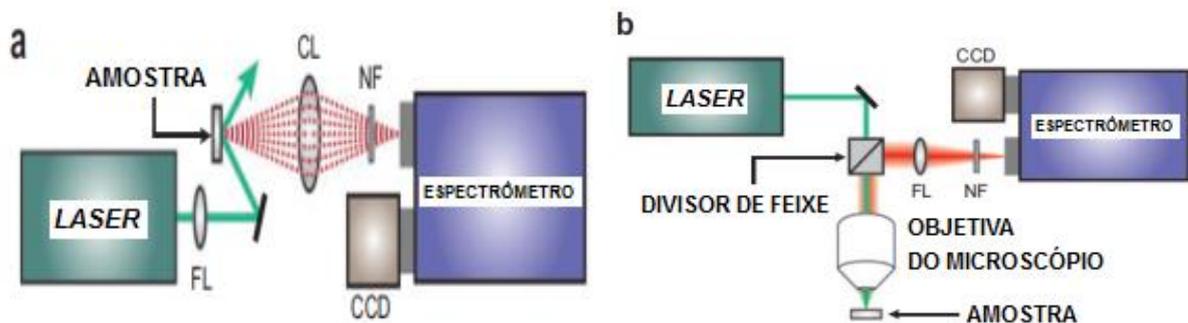
Uma das vantagens obtidas utilizando-se instrumentos multicanais está relacionada diretamente ao tempo de análise e à relação sinal/ruído (RAIMUNDO, 1997).

A sensibilidade e o desempenho de detectores CCD modernos são melhorados rapidamente. Por isso, em muitos casos, o CCD está se tornando o detector de escolha para a espectroscopia Raman (PRINCETON INSTRUMENTS, 2016).

A Figura 7 mostra uma apresentação esquemática de dois instrumentos utilizados na espectroscopia Raman. A primeira configuração (Figura 7a) é de um espectrômetro Raman onde um *laser* é focado sobre a amostra em determinado ângulo, enquanto a luz Raman é recolhida por uma lente de larga coleção. Então, a luz é focada através da fenda de entrada de um espectrômetro e detectada utilizando uma CCD resfriada por nitrogênio líquido. Este tipo de configuração é tipicamente utilizado para análises que requerem baixa resolução espacial e alta intensidade (STILES, 2008).

Para os experimentos que requerem maior resolução espacial, como já mencionado, a configuração de um micro-Raman é utilizada (Figura 7b). Após a focalização na amostra a luz é coletada pela mesma lente objetiva e então passa através de um filtro de interferência. Finalmente, a luz é focada e dirigida para o detector (STILES, 2008).

Figura 7- Diagramas esquemáticos de instrumentações típicas usadas para a espectroscopia Raman. (a) Configuração Macro-Raman. (b) Configuração Micro-Raman. Abreviaturas: CCD, charge-coupled device; CL, lentes de coleção; FL, foco da lente; NF, filtro de interferência.



Fonte: Adaptado de STILES (2008).

2.2.5 Aplicações

A capacidade de usar espectroscopia Raman tem evoluído significativamente com o desenvolvimento comercial de espectrômetros modernos, com novos softwares que facilitam a obtenção dos espectros, beneficiando muitos ramos da indústria e campos de pesquisa (DIRAMED, 2012).

A espectroscopia Raman pode ser aplicada em análises qualitativas e quantitativas de sistemas inorgânicos, orgânicos e biológicos, abrindo um enorme leque de possibilidades. Ela pode ser uma ferramenta muito útil na investigação de sistemas inorgânicos, uma vez que as soluções aquosas geralmente podem ser empregadas. Ela pode ser utilizada também no estudo da composição, estrutura e estabilidade de compostos de coordenação (SKOOG, 2007).

Em relação à análise de compostos orgânicos, a espectroscopia Raman vem sendo muito utilizada em suas caracterizações, identificando as diferentes formas cristalinas e amorfas que podem compor as amostras (LOBO et al., 2005). Essa técnica pode também ser utilizada como técnica complementar ao IR, como foi

discutido anteriormente, pois podem existir regiões de impressão digital de compostos específicos diferentes nas duas técnicas.

A espectroscopia Raman também é ideal para estudos de sistemas biológicos e médicos por três razões: i) a água é um solvente que não interfere nos espectros Raman, ii) podem ser utilizadas pequenas quantidades de amostras e iii) há a possibilidade de obter espectros em diferentes estados físicos, o que permite comparar as suas estruturas. Estas razões fizeram com que aumentasse de forma significativa o uso da espectroscopia Raman nas áreas biológicas e médicas (SALA et al., 1984; FERRARO, 2003), e em áreas como, por exemplo: ciências dos materiais, ciências forenses, indústria farmacêutica, mineralogia, nanotecnologia, entre outras (RENISHAW, 2016).

Como citado anteriormente, no início da seção, os sinais Raman são inerentemente fracos, portanto, um número muito baixo de fótons espalhados está disponível para detecção (GÓMEZ, 2014). Para suprir esta limitação da técnica, pode-se utilizar artifícios, desenvolvendo novos métodos de análise, que conseguem intensificar os sinais Raman de algumas moléculas.

Um desses artifícios que podem ser utilizados na espectroscopia Raman, é a utilização do efeito Raman Ressonante, que ocorre quando a energia da radiação de excitação é igual ou muito próxima da energia de uma das transições eletrônicas fundamentais da molécula a ser analisada. Com isso, ocorre a intensificação de determinadas bandas Raman que pode chegar a 5 ordens de grandeza (MILLEN, 2005; SANTANA et al., 2006).

Outro método que pode ser utilizado para amplificação dos sinais Raman de determinadas moléculas é a Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS). Esta é uma estratégia usual para intensificar sinais Raman fracos pelo incremento dos sinais Raman de um analito, geralmente em baixas concentrações, obtido pela amplificação do campo eletromagnético local nas proximidades de nanoestruturas metálicas, causada pela excitação de ressonância do plasmon de superfície localizado (GÓMEZ, 2014).

Este trabalho de foi baseado na técnica de SERS, a qual será melhor discutida na próxima seção.

2.3 Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS)

O efeito Raman intensificado por superfície foi observado pela primeira vez em 1974 por Fleischmann e colaboradores, quando estes tentavam estudar reações eletroquímicas de espécies adsorvidas em superfícies de eletrodos de prata através da espectroscopia Raman. Estes obtiveram um espectro de piridina em uma solução de baixa concentração com excelente relação sinal/ruído, após a modificação eletroquímica da superfície do eletrodo (FARIA, 1999). Porém o seu efeito de intensificação só foi considerado alguns anos depois por dois diferentes grupos de pesquisa (FARIA, 1999; ABDALIA, 2008). Logo após a sua descoberta, Oswaldo Sala introduziu investigações sobre este efeito aqui no Brasil, no Laboratório de Espectroscopia Molecular (IQ-USP) (SALA, 2016).

Desde então, os interesses nas pesquisas na área de SERS tem se expandido exponencialmente ao longo dos seus quase 40 anos, beneficiando uma série de descobertas, teorias e avanços tecnológicos. Na última década, a explosão das pesquisas em SERS tem sido dirigida majoritariamente pelo rápido progresso da nanotecnologia e o incentivo para aplicações químicas e biomédicas (WANG, 2015).

A espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) é baseada na obtenção dos espectros Raman de amostras adsorvidas em superfícies metálicas coloidais ou superfícies metálicas rugosas especialmente preparadas. Frequentemente são utilizados Au, Ag e Cu, embora já tenham sido utilizados vários outros metais, como lítio, cádmio, níquel, platina e paládio. Além disso, também vem sendo reportada a utilização de nanotubos de carbono com e sem nanopartículas metálicas para a obtenção de uma superfície SERS-ativa altamente sensível. As superfícies que proporcionam a intensificação dos sinais Raman são chamadas de substratos SERS-ativo (MAIMAN et al., 1961; ACEVEDO, 2009; SUN et al., 2010; ANDRADA et al., 2011).

Em um espectro SERS, as linhas Raman das moléculas adsorvidas são frequentemente intensificadas por um fator de 10^3 a 10^7 , chamado Fator de Intensificação, podendo chegar a um limite de detecção de 10^{-9} a 10^{-12} mol L⁻¹, quando aliada à técnica de Raman Ressonante, com isso, passa a ser chamada SERRS (*Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*), podendo detectar até uma única molécula (FARIA, 1999; SKOOG, 2007; FAN, 2011). Naturalmente, a técnica SERS pode ser uma ferramenta ideal para análise de traços e para o estudo

in situ de um processo interfacial, além de proporcionar o estudo de soluções altamente diluídas (CHEMISTRY LIBRE TEXTS, 2014).

A partir da década de 80 passou-se a buscar modelos teóricos para explicação da observação do efeito SERS, que até então os textos publicados ocupavam-se principalmente da verificação do fenômeno (FARIA, 1999).

De acordo com Sala (2008), há dois modelos fundamentais que buscam elucidar o mecanismo responsável pelo efeito SERS: o eletromagnético e o molecular.

2.3.1 Modelo Eletromagnético

No modelo eletromagnético, considera-se que o único fator responsável pelo efeito de intensificação SERS é o aumento do campo elétrico local. Dessa forma, a polarizabilidade efetiva não seria afetada pela adsorção, segundo esse modelo (UFSC, 2012).

Quando uma superfície metálica nanoestruturada é excitada por um campo eletromagnético incidente, os elétrons livres na superfície das partículas oscilam coletivamente, promovendo ampliação do campo elétrico no local. Esse fenômeno é chamado de efeito de ressonância do plásmon de superfície (*Surface Plasmon Resonance*, SPR), o qual produz propriedades de absorção e dispersão elétricas intensas. A SPR dependerá do tamanho da partícula de origem, de sua composição e forma (HAO et al., 2007; COSTA, 2009).

A SPR permite a geração de campos coulombianos de longo alcance.⁶³ Isso explicaria as intensificações a longas distâncias e o espectro obtido seria similar ao obtido da molécula em solução, uma vez que o campo elétrico depende da distância entre a molécula e a superfície ($1/r$), e não depende, assim, do contato entre elas. Portanto, de acordo com este mecanismo, a molécula adsorvida não seria afetada (FARIA, 1999).

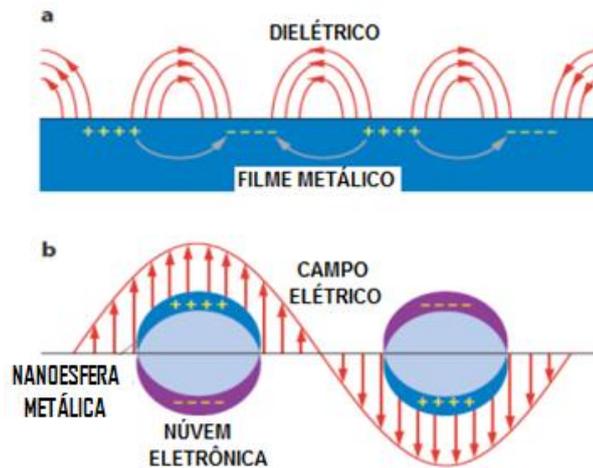
A frequência do plásmon de um metal dependerá apenas da densidade de elétrons livres. Para a maioria dos metais essas frequências ocorrem na região do ultravioleta (UV). Já os metais alcalinos e alguns metais de transição (Au, Cu e Ag) exibem frequência de plásmon na região do visível (LU et al., 2009).

A Figura 8(a) ilustra como o plásmon oscila ao longo de uma superfície metálica com a propagação de uma onda eletromagnética, se a oscilação coletiva dos elétrons livres está relacionada a um volume finito. Já a Figura 8(b) mostra a interação entre o campo elétrico da luz incidente e os elétrons livres de esferas de

metal cujos tamanhos são menores do que o comprimento de onda da luz incidente (LU et al., 2009).

O campo elétrico faz com que os elétrons livres se afastem da partícula em uma direção, criando um dipolo que pode mudar de direção com a mudança do campo elétrico (LU et al., 2009). Esse efeito pode ser chamado de ressonância do plásmom de superfície localizado (*localized surface plásmom resonance*, LSPR) (STILES et al., 2008).

Figura 8- Representação da propagação de plásmoms de superfície em (a) uma superfície metálica e (b) localizados em nanoesferas.



Fonte: Adaptada de LU et al. (2009).

De acordo com Sharma et. al. (2012), a intensificação resulta da amplificação da luz pela LSPR. Esta concentração da luz ocorre preferencialmente em aberturas, fendas ou características nítidas de materiais plasmônicos, que são tradicionalmente metais nobres (prata, ouro, cobre) em escalas nanométricas (SHARMA et al., 2012).

As regiões onde o campo eletromagnético é mais intensificado são chamadas de “*hot-spots*” (FAN, 2011). Quando uma molécula está ligada, adsorvida ou próxima a um *hot-spot* a intensificação do sinal Raman pode ser observada (GÓMEZ, 2014).

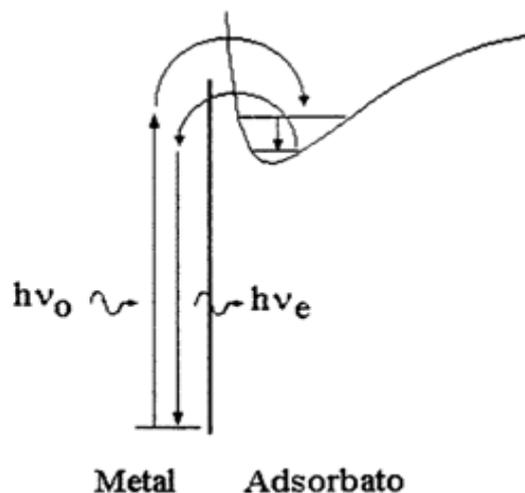
Este modelo explica com sucesso a maioria dos resultados experimentais, mas não todos eles, uma vez que não leva em consideração a dependência da amplificação SERS com a estrutura química da molécula estudada, conhecida como molécula sonda (FAN, 2011).

2.3.2 Modelo Molecular

Outro modelo que pode tentar explicar, junto com o modelo eletromagnético, de que maneira ocorre o efeito SERS, é o modelo molecular, conhecido também como modelo químico. Este modelo considera as mudanças na polarizabilidade molecular, α , gerados através da interação da molécula adsorvida e a superfície metálica, ou seja, neste modelo deve haver contato da molécula com a superfície. Com isso, os modos vibracionais da molécula podem mudar, e assim o espectro obtido pode ser diferente daquele obtido pela espectroscopia Raman normal. A interação pode ocorrer com a formação de complexos de transferência de carga, ligações químicas convencionais com a superfície ou ainda interações eletrostáticas (par iônico) (SALA, 2008).

O modelo supõe que um elétron do nível de Fermi do metal é excitado por um fóton incidente, criando um par elétron-buraco. O elétron é transferido por efeito túnel, ou seja, atravessa uma região em que a energia potencial é maior que a sua energia total (WIKIPEDIA, 2016), para o nível eletrônico da molécula adsorvida (LUMO), a qual tende a adquirir uma nova configuração de equilíbrio. Em seguida, voltando ao metal, o elétron deixaria a molécula adsorvida no modo vibracional excitado. Assim o par elétron-buraco, ao ser quebrado, eliminaria o fóton espalhado com maior intensidade, como ilustrado na Figura 9 (OTTO, 1991; FARIA, 1999; BANHOLZER, 2008).

Figura 9- Diagrama ilustrativo do mecanismo de intensificação SERS através do modelo químico.



Fonte: FARIA (1999).

Naturalmente, este efeito varia de molécula para molécula. Geralmente as moléculas contendo átomos de enxofre e nitrogênio são eficientes na observação do efeito, pois são átomos que possuem grande afinidade química com a superfície de metais como Au e Ag. Este efeito também depende da diferença de energia entre o nível de Fermi do metal e o LUMO do adsorbato (SALA, 2008; BANHOLZER et al., 2008).

Após décadas de debates, hoje é geralmente aceito que o mecanismo eletromagnético (EM) é o contribuinte dominante para a maioria dos processos SERS (SHARMA et al., 2012). Assim, de acordo com este modelo, grande parte dos pesquisadores busca produzir e/ou modificar substratos SERS-ativos (HICKS, 2001; BAKER, 2005; BANHOLZER et al., 2008).

2.3.3 Substratos SERS-ativos

Desde que os modelos teóricos para o SERS começaram a serem propostos, muitos tipos de substratos foram testados. Porém, os mais empregados são os coloides, os eletrodos e filmes depositados a vácuo, que são de fácil preparação (FARIA, 1999; MILLEN, 2005).

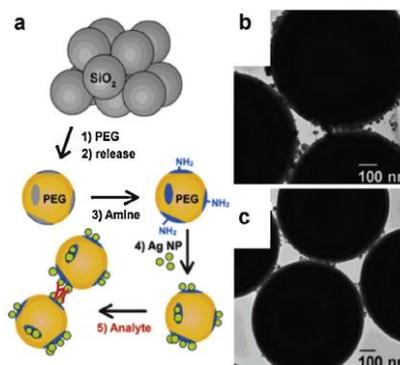
Como dito na seção anterior, os primeiros estudos relatados sobre a observação do efeito SERS foram realizados em eletrodos de Ag. O substrato em questão passou a ter atividade SERS quando sua superfície foi modificada por ciclos redox, deixando a superfície áspera e com isso, foi obtido o espectro de piridina com alta relação sinal/ruído (BAKER, 2005; SALA, 2008; WIKIPEDIA, 2016).

O primeiro parâmetro a ser considerado em um experimento SERS é a escolha do substrato de intensificação (SHARMA et al., 2012; GÓMEZ, 2014), que pode ser arbitrariamente classificado em três categorias: NPs em suspensão; NPs imobilizadas em um substrato sólido; nanoestruturas fabricadas diretamente em um substrato sólido (FAN, 2011).

As estratégias de síntese para diferentes formas e tamanhos de nanoestruturas abrangem uma série de procedimentos. Os experimentos mais simples de SERS são realizados com NPs em suspensão na presença de certa concentração da molécula sonda. A principal desvantagem neste tipo de abordagem é que a reprodutibilidade na agregação das nanoestruturas, e como consequência a formação dos *hot-spots*, é desafiadora. Por outro lado, a agregação é por vezes necessária para a observação do efeito SERS (FAN, 2011).

Uma variedade de abordagens tem sido desenvolvida para controlar a agregação de nanopartículas plasmônicas para um efeito SERS sensível e reprodutível. Uma maneira simples é a adição de moléculas ligantes bifuncionais como os ditiois e diaminas. Como reportado por Braun et al. (2007), onde utilizaram diaminas como ligantes entre partículas em microesferas de sílica, em que NPs de prata foram agregadas (Figura 10). No entanto, esta abordagem limita a difusão dos analitos nas junções entre as partículas (BRAUN et al., 2007; SHIOHARA, 2014).

Figura 10- (a) Esquema de um processo em cinco etapas para a ligação molecular controlada de nanopartículas em um modelo microesferas montadas; (b) e (c) Imagens de MET da ligação entre duas microesferas



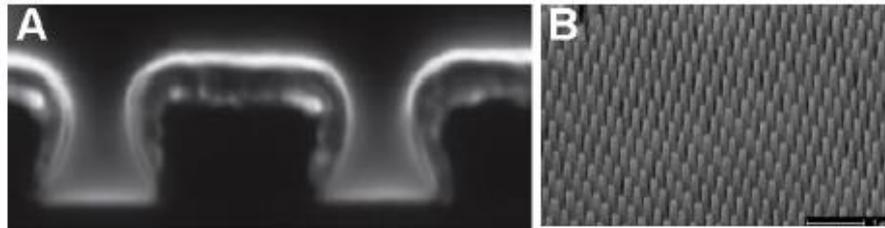
Fonte: SHIOHARA (2014).

Uma abordagem diferente para a produção de substratos SERS ativo consiste na obtenção do substrato pela imobilização de NPs em plataformas planas. Como por exemplo, a imobilização de nanopartículas de ouro ou prata em suportes de vidro pode ser feita pela modificação da superfície do vidro por derivados de silanos, tais como aminopropiltrimetoxissilano ou mercaptopropiltrimetoxissilano. A adesão das NPs aos suportes sólidos normalmente é muito baixa, e técnicas de imobilização específicas devem ser desenvolvidas para manter a integridade e o desempenho do substrato, deixando-o estável ao longo do tempo (FAN, 2011).

Muitos substratos SERS têm sido desenvolvidos também usando fotolitografia e nanolitografia. As técnicas modernas de nanolitografia mais utilizadas são o feixe de íons focalizado (FIB) e litografia por feixe de elétrons (*e-beam*). Estas técnicas permitem o controle fino sobre o tamanho e forma das nanoestruturas, o que pode ser a principal vantagem da técnica, pois permite uma reprodutibilidade muito elevada nas intensidades SERS destes substratos (FAN, 2011).

A fotolitografia é um processo relativamente barato e com alto rendimento e uniformidade, tornando-a com papel único no desenvolvimento de substratos SERS. Como por exemplo, a Litografia Ultravioleta Extrema (EUVL), seguida da evaporação do metal, permitiu a geração de nanofendas periódicas de ouro modeladas sob uma área de ordem de mm^2 (Figura 11). O substrato exibiu alta intensificação SERS ($\sim 2 \times 10^6$ em média), intensificação homogênea e possível reutilização sem degradação ou diminuição de intensificação (SHIOHARA, 2014).

Figura 11- Imagens de MET de: (a) seção transversal e (b) vista superior de nanofendas produzidas por EUVL.



Fonte: SHIOHARA (2014).

Como um caminho alternativo para a geração de *hot-spots*, a fabricação de nanopartículas anisotrópicas tem sido largamente estudada (SHIOHARA, 2014). Entre as várias nanoestruturas anisotrópicas, algumas nanopartículas em forma de flor estão atraindo o interesse dos cientistas devido a não só proporcionarem um efeito óptico superior, mas também por poderem ser utilizadas como catalisadores cuja atividade e seletividade estão fortemente dependentes da morfologia (SUN et al., 2014).

As nanoestruturas de prata são as mais comuns, pois fornecem a maior intensificação, porém sofrem oxidação e outros ataques químicos. As nanoestruturas de ouro, como as utilizadas neste trabalho, são qualificadas para o uso em diversas aplicações SERS, uma vez que também produzem grande intensificação, são biocompatíveis, e podem ser quimicamente funcionalizadas (BAKER, 2005), como reportado por Khoury e colaboradores (2008).

Diversos substratos SERS ativos a partir de nanopartículas de ouro já foram produzidos, Minghua Wang e colaboradores (2010) reportam a fabricação de uma superfície metálica rugosa pela formação de uma película porosa ultrafina de ouro na interface ar-água, a qual se mostrou um substrato SERS-ativo estável,

promovendo uma intensificação SERS forte e consistente. O desafio atual na produção de substratos SERS-ativo é a obtenção de substratos altamente reprodutíveis, que gerem alta intensificação e que sejam de fácil preparação, como é o caso dos coloides.

O nosso trabalho está baseado na preparação de um substrato SERS-ativo a partir de um coloide de ouro estabilizado inicialmente em óleo de mamona e imobilizado com o auxílio de uma matriz orgânica sólida de óleo de mamona hidrogenado, que será mais bem discutido no capítulo 3.

2.3.4 Fator de Intensificação SERS (EF)

O Fator de Intensificação (EF) SERS médio é geralmente citado como um indicador de qualidade de um novo substrato SERS. No entanto, é importante salientar que os EF são geralmente estimados por várias aproximações. Além disso, eles podem depender de outros fatores, tais como o sistema molecular utilizado, comprimento de onda de excitação (FAN, 2011). Em geral, os EF médios de NPs imobilizados variam de 10^3 A 10^7 (SKOOG, 2007; FAN, 2011). Embora EF maiores já tenham sido reportados por alguns grupos, da ordem de 10^{10} , estes são incomuns e raramente são reproduzidos ou confirmados por um grupo diferente (FAN, 2011).

Para estimar um valor para o EF, geralmente utiliza-se a equação (WANG et al., 2008):

$$EF = \frac{I_{SERS}/N_{ads}}{I_{bulk}/N_{bulk}} \quad (10)$$

Onde, I_{SERS} e I_{bulk} se referem à intensidade de uma das bandas no espectro SERS e da mesma banda no espectro Raman normal da amostra da molécula pura no estado sólido, respectivamente, as quais podem ser obtidas experimentalmente. N_{ads} e N_{bulk} se referem ao número de moléculas adsorvidas no substrato e na amostra sólida, respectivamente, sob a área do ponto do *laser*, já estes valores são estimados através de cálculos utilizando o volume da amostra o qual o laser incide, a densidade da molécula e sua concentração na solução utilizada para a obtenção do espectro SERS (WANG et al., 2008).

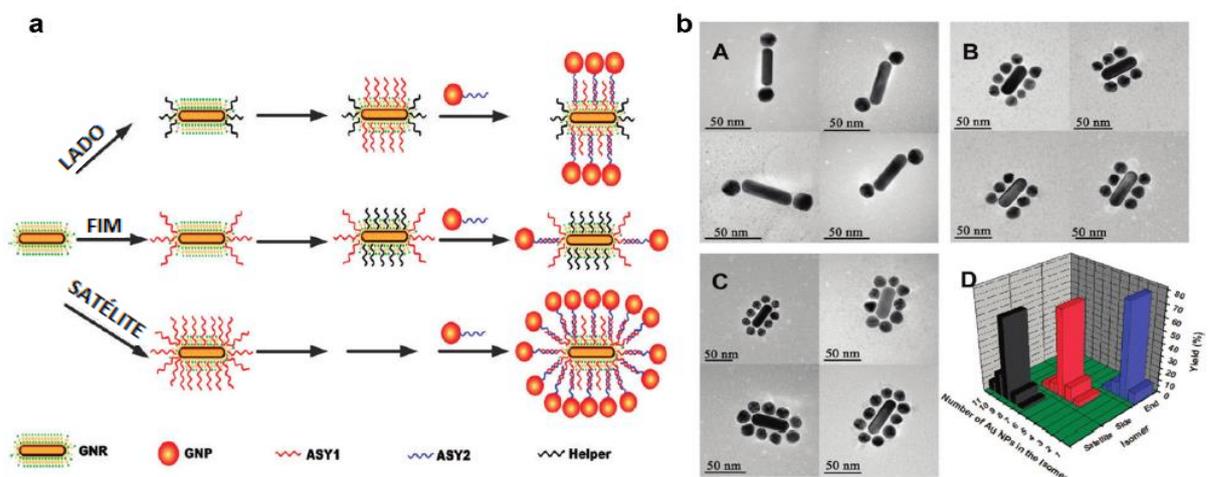
2.3.5 Aplicações em SERS

Desde que foi descoberta, a técnica de SERS vem se tornando cada vez mais atrativa para diversas aplicações. O poder da técnica está associado à sua capacidade de identificar espécies químicas e também de obter informações estruturais em uma ampla variedade de áreas, tais como: biossensores, espectroeletróquímica, análises ambientais, fibra óptica, biomedicina, catálise, e em muitas outras áreas (FAN, 2011; SHARMA et al., 2012).

SERS é uma técnica altamente sensível e seletiva para utilização na detecção de amostras biológicas e assim como para fins de diagnóstico, incluindo doenças como câncer, doença de Alzheimer e de Parkinson (FAN, 2011; SHARMA et al., 2012).

Nanobastões e nanoesferas de ouro montados com diferentes geometrias (Figura 12) foram utilizados como substratos SERS para estudos de metabolismo celular (SHIOHARA, 2014).

Figura 12- (a) Esquema do método de síntese para montagem regioespecífica de NP. (b) Imagens de MET de: (A) esferas montadas no fim dos nanobastões, (B) ao lado dos nanobastões e (C) ao redor de todo o nanobastão. (D) Análise estatística do número de AuNPs montadas através das diferentes rotas.



Fonte: Adaptada de SHIOHARA (2014).

SERS é uma técnica favorável também para análises ambientais, pois fornece impressões digitais espectroscópicas vibracionais para analitos específicos com alta sensibilidade de detecção. Muitas novas aplicações de SERS na área ambiental têm sido reportadas na literatura, incluindo detecção de poluentes orgânicos, metais

potencialmente tóxicos, patógenos em amostras ambientais, entre outros (LI et al., 2014).

Para o monitoramento de reações catalíticas, SERS oferece vantagens atraentes. Além de poder fornecer informações vibracionais específicas das moléculas sob a superfície do catalisador, até mesmo de uma única molécula, reflete o processo catalítico real, onde o catalisador pode ser o próprio substrato SERS, como reportaram Cai et. al. (2014) ao utilizarem um substrato de Au e Cu como catalisadores para a degradação de poluentes e ao mesmo tempo como substrato para o monitoramento desta reação (CAI et al., 2014).

A gama de aplicações para esta técnica é muito vasta, podendo se encaixar em diversas áreas do conhecimento, e se tornando uma ferramenta bastante útil, principalmente quando aliada a outras técnicas.

Neste trabalho de tese foi realizado o desenvolvimento de um substrato com atividade SERS, sua caracterização e estudos para possíveis aplicações, como poderão ser vistos nos próximos capítulos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho foi iniciado com a síntese das nanopartículas de ouro utilizando citrato trissódico como agente redutor e óleo de mamona como meio dispersante e estabilizante, seguindo o procedimento já consolidado em nosso grupo desenvolvido por Moraes e colaboradores (2013). Em seguida, as amostras obtidas foram caracterizadas utilizando as técnicas de absorção molecular no ultravioleta-visível e microscopia eletrônica de transmissão. Após as devidas caracterizações, foi utilizado óleo de mamona hidrogenado para imobilização das nanopartículas e obtenção do substrato SERS-ativo para posteriores testes e aplicações. A atividade SERS do substrato foi testada utilizando como moléculas sondas: Benzotiofeno (BTF), Tiofeno (TF), 4-Aminotiofeno (4-ATP), Cisteamina e Cisteína.

3.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro

Antes da síntese, toda a vidraria foi tratada com água régia e lavada com água e detergente, para diminuir os riscos de contaminação. Todas as vidrarias foram isoladas para uso exclusivo neste trabalho, uma vez que além da síntese de AuNPs exigir uma limpeza diferenciada, os trabalhos com SERS também o exigem.

Foram preparadas nanopartículas de ouro, como já mencionado, seguindo os procedimentos de Moraes e colaboradores (2013) que reportaram um método de síntese adaptado de um método bastante utilizado, de Turkevich (1951). O método consiste na redução do Au(III) a Au(0), na presença de citrato trissódico e óleo de mamona.

A fonte de ouro utilizada foi o ácido tetracloroáurico(III) tri-hidratado (ACROS ORGANICS), onde preparou-se uma solução de 25 mM pela adição de 1,0 g do ácido ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) à 100 mL de água deionizada – 1% (m/v). A solução resultante foi colocada em um frasco de Schlenck sob vácuo e em seguida sob atmosfera inerte de argônio, esta solução foi estocada ao abrigo da luz.

A solução com o agente redutor, citrato trissódico di-hidratado (MERCK), foi preparada em 1% (m/v), pela dissolução de 0,1 g de citrato em 10 mL de água deionizada e utilizada logo após a preparação.

A síntese das nanopartículas de ouro consistiu na adição inicial de 10 mL de óleo de mamona purificado (CITY CHEMICAL LLC) e 10 mL de etanol (DINÂMICA) a um sistema reacional, como o mostrado na Figura 13. Este sistema é composto por um balão de vidro acoplado a um condensador sobre uma chapa de aquecimento e

agitação magnética, com termômetro. O sistema foi deixado sob agitação vigorosa e à temperatura de 50 °C antes da adição dos demais reagentes.

Figura 13- Imagem do sistema utilizado nas sínteses das nanopartículas de ouro.

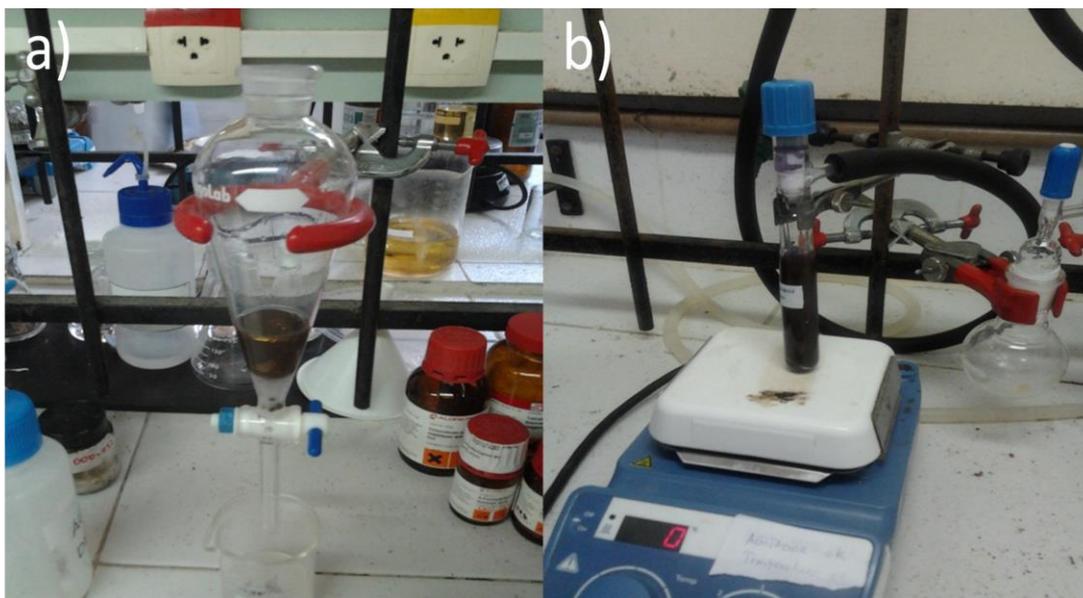


Fonte: autora da tese, 2017.

Em seguida, ao balão foram adicionados 2,0 mL da solução de ácido tetracloroáurico(III) e 2,5 mL da solução de citrato, preparados anteriormente. E então, elevou-se a temperatura do sistema reacional para 80 °C, deixando-os com agitação e temperatura constante por aproximadamente 20 h.

Logo após, o produto da reação foi lavado com água deionizada, e transferido para um frasco de Schlenck, onde foi submetido à secagem a alto vácuo por aproximadamente 7 h (Figura 14). Finalmente, um coloide com coloração azul escuro foi obtido.

Figura 14- Imagens das etapas de (a) lavagem e (b) secagem do produto da síntese.



Fonte: autora da tese, 2017.

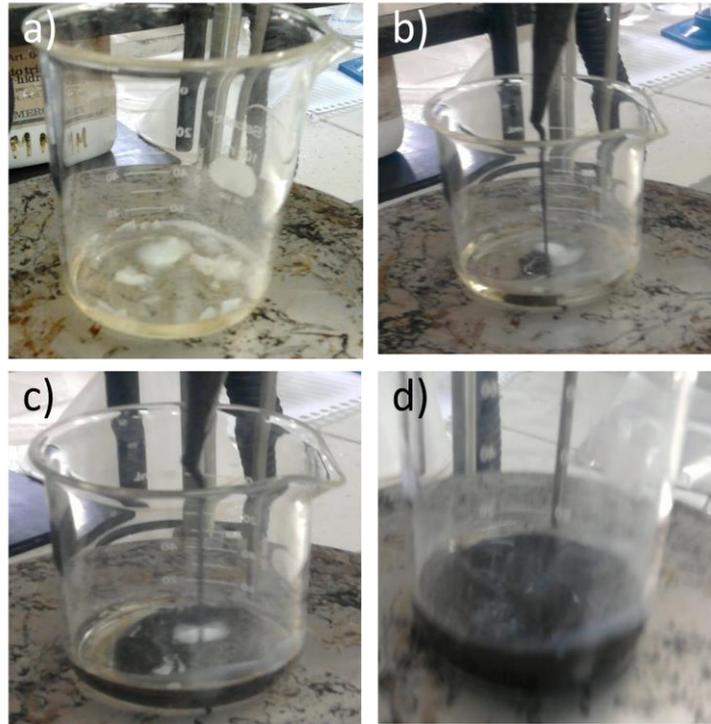
Antes da preparação do substrato sólido, o coloide obtido foi estocado em tubo de plástico a temperatura ambiente, até que todas as caracterizações fossem realizadas, Espectroscopia por Absorção no Ultravioleta-visível (UV-vis) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), os procedimentos adotados para as caracterizações serão descritos na seção 3.3.

3.2 Preparação dos Substratos SERS-Ativos

Os substratos foram preparados para teste de atividade SERS, onde se imobilizou os coloides líquidos obtidos previamente em óleo de mamona hidrogenado (BOM BRASIL ÓLEO DE MAMONA), e outro substrato, apenas com óleo de mamona e óleo de mamona hidrogenado, para análise do branco.

Inicialmente, colocou-se 5 g de óleo de mamona hidrogenado sob agitação e aquecimento a 90 °C, para sua fusão. Em seguida, foram adicionados 5 mL do coloide a base de AuNPs dispersas em óleo de mamona, mantendo o sistema a temperatura constante até que a mistura se tornasse homogênea, como ilustrado na Figura 15, a seguir.

Figura 15- Imagens das primeiras etapas na produção do substrato. (a) Óleo de mamona hidrogenado fundindo; (b) e (c) adição do coloide; (d) mistura final.

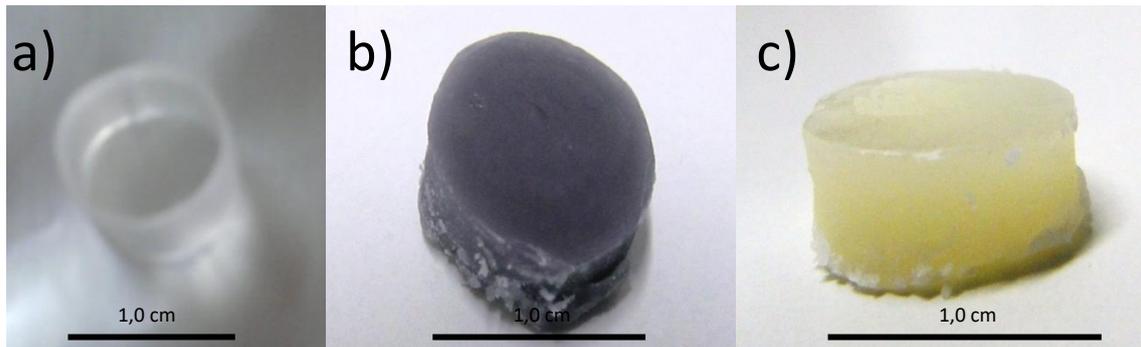


Fonte: autora da tese, 2017.

Nos primeiros testes para a obtenção dos substratos sólidos alíquotas de 400 μL da mistura foram coletadas e transferidas para uma forma, em formato cilíndrico, com aproximadamente 1,0 cm de diâmetro sob uma superfície lisa de uma folha de papel alumínio, ficando em repouso por 2 min até seu retorno à temperatura ambiente e total solidificação. Em seguida, o material foi retirado da forma, e o substrato ficou pronto para os testes, conforme demonstrado na Figura 16(b).

O mesmo procedimento foi realizado para preparação do substrato usado como branco, a única diferença foi que no lugar da adição do coloide, foi adicionado óleo de mamona puro e o resultado pode ser observado da Figura 16(c).

Figura 16- Etapa final da preparação dos substratos. (a) forma de plástico; (b) substrato SERS ativo pronto; (c) substrato branco (sem AuNPs) pronto.



Fonte: autora da tese, 2017.

O substrato contendo as nanopartículas apresentou a cor de seu coloide de origem, ou seja, azul-violeta. Já o substrato branco, que não contém nanopartículas, resultou em um material amarelado, com aparência de uma cera.

Após a preparação dos substratos e alguns testes feitos, foi observado que a quantidade de material utilizada da maneira como foi feito inicialmente era acima do necessário. E então, preparou-se o substrato de outra maneira, como descrito a seguir.

Foram utilizadas alíquotas de apenas 40 μL do material líquido e gotejados em placas de vidro para solidificação, para um melhor aproveitamento dos substratos, uma vez que são necessárias pequenas quantidades de amostras para análise Raman.

Foi observado também que preparando o substrato da maneira como foi descrito anteriormente, com apenas 40 μL , ainda assim havia muito desperdício de amostra e de material, uma vez que cada placa produzida utilizava uma ponteira para micropipeta diferente e restava sempre uma parte do material solidificado na mesma.

Então, o substrato passou a ser preparado de uma terceira forma: após a fusão do óleo de mamona hidrogenado e da completa homogeneização com o coloide, todo o material foi despejado sobre a superfície lisa de uma folha de papel alumínio e foi obtido um único substrato, que para ser utilizado em todas as análises Raman era cortado em pedaços menores e pesado na hora da utilização.

O substrato também foi submetido à caracterização por absorção no UV-vis, porém não foi possível a caracterização do material por MET, devido à dificuldade na preparação desta amostra.

3.3 Técnicas de Caracterização das Nanopartículas de Ouro

O coloide e o substrato obtidos foram caracterizados por Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-Visível (UV-vis), e somente o coloide foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), como será descrito nas próximas seções.

3.3.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)

Nas caracterizações feitas por UV-vis, as amostras, o coloide e substrato sólido, foram analisadas em um espectrofotômetro modelo Shimadzu UV-3600, o qual foi configurado para a correção da linha de base do óleo de mamona e foi utilizada uma faixa de absorção de 400 a 900 nm. Foi utilizada cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 mm para análise do coloide. Para análise do substrato sólido, o mesmo foi preparado diretamente sob o acessório para sólidos (esfera integradora), pois era necessário o preenchimento completo do mesmo, esta análise foi corrigida pela linha de base do substrato branco, preparado da mesma maneira.

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As caracterizações feitas por MET foram realizadas no Centro de Tecnologia do Nordeste (CETENE), localizado em Recife/PE, onde foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI modelo Tecnai 20, de 200 kV, com emissor LaB₆ ou W, módulo EDAX, módulo de tomografia Xplore3D, suporte de aquecimento controlado, resolução de ponto de 0,2 nm e de linha de 0,1 nm, com magnificação de até 1 milhão de vezes.

Para as análises, foram colocadas películas das dispersões coloidais obtidas em óleo de mamona, sem nenhuma outra preparação, em uma grade de cobre de 200 *mesh* recoberta com filme de carbono. A preparação dos filmes foi realizada com 24 h de antecedência das análises e estes foram mantidos no dessecador.

3.4 Teste dos Substratos

Para o teste dos substratos foi utilizado um Microscópio Raman, que será detalhado na seção 3.5.

Inicialmente foram feitas as análises de Espectroscopia Raman do coloide, do óleo de mamona, do óleo de mamona hidrogenado e dos substratos sólidos, com e sem nanopartículas, para a obtenção de espectros para futuras comparações.

A atividade dos substratos foi testada utilizando 4-Aminotiofenol (4-ATP), Benzotiofeno (BTF), Tiofeno (TF), Cisteamina e Cisteína, como moléculas sonda de interesse.

3.4.1 4-Aminotiofenol (4-ATP) como molécula sonda

A primeira molécula sonda investigada foi o 4-ATP (ALDRICH), por ser uma molécula muito utilizada em estudos SERS. Onde inicialmente foi preparada uma solução estoque com $2,88 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de 4-ATP pela dissolução de 180,2 mg em 50 mL de solução, seguida de diluições até as concentrações de 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} e $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de 4-ATP em etanol. Como os resultados foram melhores do que os esperados, as soluções foram ainda mais diluídas até as seguintes concentrações: 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-10} , 1×10^{-11} e $1 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ de 4-ATP em etanol.

Amostras de substrato de aproximadamente 25 mg, com e sem nanopartículas de ouro, foram mergulhadas em aproximadamente 10 mL das soluções com diferentes concentrações de 4-ATP, onde permaneceram imersos por 24 h. Com exceção do substrato sem nanopartículas de ouro que foi imerso apenas na solução de maior concentração.

Passado esse tempo, os substratos foram retirados das soluções, deixados à temperatura ambiente, na capela, para secagem do solvente, e após aproximadamente 20 min foram realizadas as análises em três diferentes modos: i) estático (centrado em 750 cm^{-1}); ii) estendido (variando de 100 a 3200 cm^{-1}); e iii) mapeamento (centrado em 750 cm^{-1}), em que, deste último são registrados aproximadamente 150 espectros em pontos diferentes de uma determinada área do substrato.

3.4.1.1 Estudo do tempo de imersão

Foram realizadas análises Raman do substrato após imersão em uma solução de 4-ATP com concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹ com diferentes tempos de imersão do substrato na mesma. Os tempos utilizados foram: 1, 2, 3, 6, 12 e 24 h.

3.4.1.2 Estudo do tempo de permanência da molécula sonda no substrato

Análises também foram realizadas no substrato com diferentes tempos após a retirada do mesmo de uma solução com concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹, estas análises foram feitas após decorridas 0,3, 1, 2, 24, 48, 168 e 336 h, sendo realizadas na mesma região de análise do substrato.

3.4.2 Benzotiofeno (BTF) como molécula sonda

A atividade do nosso substrato também foi testada utilizando como molécula sonda o Benzotiofeno (ALDRICH), onde foi inicialmente preparada uma solução com concentração de 1×10^{-1} mol L⁻¹ de BTF em etanol (ALDRICH), utilizada como solução estoque. A solução estoque foi preparada pela dissolução de 1,17 mL de BTF em etanol até completar um volume de 100 mL em um balão volumétrico.

Em seguida, foram preparadas soluções com concentrações de 1×10^{-2} ; 1×10^{-3} ; 1×10^{-4} ; 1×10^{-5} ; 5×10^{-6} ; 1×10^{-6} ; e 5×10^{-7} mol L⁻¹ de BTF, realizando diluições sucessivas a partir da solução estoque.

Foram seguidos os mesmos procedimentos que foram adotados para as análises Raman do 4-ATP, descritos em 3.4.1.

3.4.3 Tiofeno (TF) como molécula sonda

O substrato também foi testado utilizando como molécula sonda o Tiofeno (ALDRICH). Para isto, preparou-se uma solução estoque de TF com concentração de 1×10^{-1} mol L⁻¹, pela diluição de 400,3 µL em etanol, até completar o volume de 50 mL, em um balão volumétrico. Por diluições sucessivas, foram preparadas também soluções com concentração de 1×10^{-2} ; 1×10^{-3} ; 1×10^{-4} ; 1×10^{-5} ; e 1×10^{-6} mol L⁻¹ de TF.

Os procedimentos adotados para as análises Raman foram idênticos aos utilizados com as moléculas sonda anteriores.

3.4.4 Cisteamina como molécula sonda

Para fins de teste na área biológica, o substrato também foi testado com a molécula sonda Cisteamina (ALDRICH). Para isto, utilizou-se solução de cisteamina em etanol com concentração de $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, preparada pela dissolução de 387,3 mg em 50 mL de etanol. Para as análises foram seguidos os procedimentos descritos em 3.4.1.

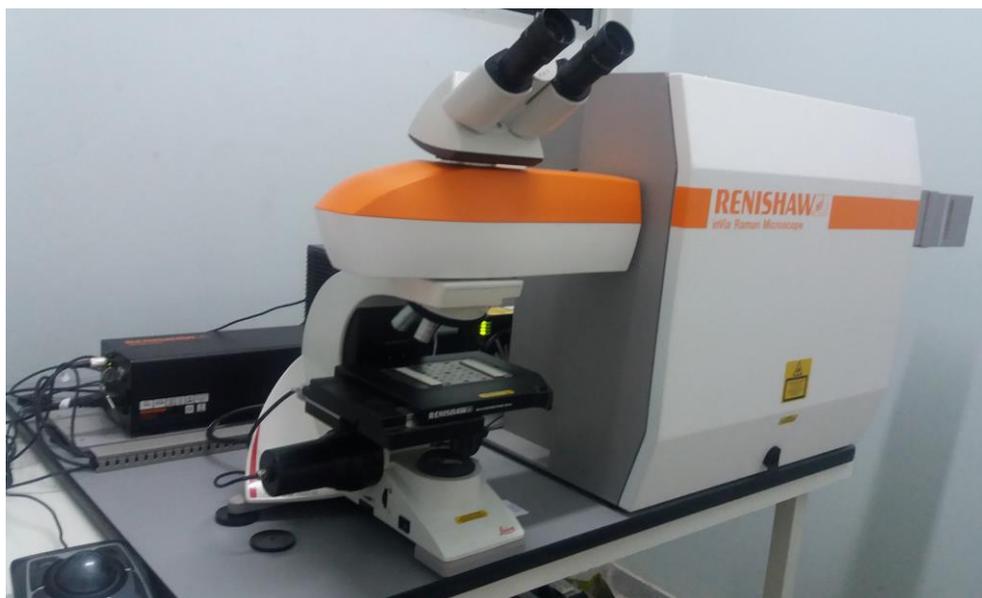
3.4.5 Cisteína como molécula sonda

Outra aplicação biológica para o substrato pode ser testada utilizando Cisteína (ALDRICH) como molécula sonda. Assim, uma solução com concentração de $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol foi preparada, dissolvendo 302,5 mg de cisteína em 50 mL etanol. Os procedimentos foram os mesmos que os seguidos em todos os testes anteriores.

3.5 Análises de Espectroscopia Raman

Para as análises Raman realizadas foi utilizado um microscópio Raman, instalado junto ao Grupo de Catálise e Reatividade Química da Universidade Federal de Alagoas, Renishaw inVia Raman Microscope, modelo inVia Reflex, mostrado na Figura 17. Este equipamento possui dois *lasers*, um com comprimento de onda de 785 nm e outro com comprimento de onda de 633 nm, porém para nossas análises, foi utilizado apenas o *laser* de 785 nm, uma vez que o de 633 nm promovia fluorescência em muitas de nossas amostras o que dificultava a observação dos espectros. Neste equipamento foi utilizada uma objetiva de aumento de 50x para focar o feixe da radiação na amostra, método de varredura (estendido) com tempo de exposição de 10 s e 5 acumulações, com potência na saída do *laser* de ~10 mW; método estático com tempo de exposição de 1 s e 50 acumulações, com potência na saída do *laser* de ~50 mW; e método de mapeamento com exposição de 2 s e 1 acumulação, com potência na saída do *laser* de ~50 mW e com números médios de 150 espectros.

Figura 17- Imagem de um Renishaw inVia Raman Microscope.



Fonte: autora da tese, 2017.

3.6 Análise e tratamento de dados

Para análise e tratamentos de dados foram utilizados os programas de processamento de espectros: Wire 3.4 (Renishaw); Opus 3.5 (Bruker); GRAMS AI; e OringinPro 8.

O programa Wire 3.4 é o software utilizado no próprio microscópio Raman, e o mesmo contribuiu para a transformação do espectro originado do mapeamento em espectros independentes, além de promover a retirada dos ruídos espectrais causados por raios cósmicos.

Em seguida, foi utilizado o programa Opus 3.5; este serviu para realizar o cálculo dos espectros médios obtidos do mapeamento e que serão utilizados para discussão dos resultados.

O software GRAMS AI foi utilizado para ajustes nas linhas de bases dos espectros médios e para normalizar os mesmos em relação a uma das bandas referentes ao óleo de mamona.

Por fim, foi utilizado o programa OringinPro 8 para confecção dos gráficos relacionando as intensidades, ou áreas das bandas, com as concentrações das moléculas sonda.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há mais de um século, muitos grupos de pesquisa se dedicam à obtenção, caracterização e aplicações de nanopartículas anisotrópicas de ouro, principalmente devido as suas propriedades ópticas, estruturais, eletromagnéticas e catalíticas diferenciadas quando comparada à AuNPs na forma esférica. Muitos trabalhos são reportados na literatura utilizando AuNPs de formas anisotrópicas, e a maior parte deles emprega a síntese por via úmida mediada por semente para a produção controlada de nanopartículas de um modo geral (LI, 2014).

Como já mencionado anteriormente, nosso grupo de pesquisa buscou desenvolver métodos de síntese de AuNPs, onde foi verificado que o óleo de mamona era um excelente candidato a ser utilizado como matriz dispersante com propriedades que levaram a coloides estáveis ao longo do tempo (MORAIS et al., 20013). Dessa forma, esses sistemas, soluções líquidas coloidais, sendo posteriormente imobilizadas em óleo de mamona hidrogenado, poderiam levar a diversas aplicações bastante interessantes em biomedicina, catálise, na geração de dispositivos ópticos (DA SILVA, 2009), assim como na Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (MORAIS et al., 20013), objetivo principal deste trabalho.

A seguir, estão descritos alguns resultados de nossas pesquisas que levaram ao desenvolvimento de um material contendo partículas coloidais de ouro (AuNPs) dispersas em óleo de mamona e sua aplicação em SERS.

4.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

Para a elaboração de nossos sistemas coloidais, nosso grupo adaptou uma das metodologias mais empregadas para a produção de NPs de Au, desenvolvida por Turkevich (1951), em que, em meio aquoso, utiliza-se o citrato como agente redutor e estabilizante. No nosso caso, o citrato foi empregado em meio não aquoso. Novamente investigamos se essa adaptação poderia ser empregada para a síntese de AuNPs por transferência de fase. Imediatamente verificamos que a metodologia era eficaz e que, dependendo das condições de síntese, diferentes coloides poderiam ser obtidos e, conseqüentemente, diferentes nanoestruturas.

Dentre as nanopartículas obtidas em trabalhos anteriores, em uma das condições empregadas, foram obtidas AuNPs em forma irregulares, semelhantes a estrelas. Tais partículas em forma de estrelas já mostraram significativo efeito de

intensificação SERS (HAO et al., 2007). Além disso, em trabalhos anteriores de nosso grupo esse sistema já mostrou potencial atividade para SERS tendo-se como molécula sonda a piridina (PACHECO, 2012). Essas verificações nos impeliram a continuar a estudar esse sistema coloidal em particular para o aperfeiçoamento de substratos SERS.

Como descrito no capítulo anterior, através do método utilizado, foi possível a obtenção de um coloide de coloração azul, em que a solução inicial, antes da reação, era amarelo transparente, cor do óleo de mamona, e imediatamente após a adição da solução com o agente redutor, ela passou de incolor para azul escuro (Figura 18), o que pode caracterizar a obtenção de coloides de nanopartículas de ouro. As cores dos coloides são características de seus respectivos plásmons de superfície em ressonância com as frequências da luz incidente (OLHAR NANO, 2016). Isso pôde ser confirmado através das técnicas de caracterização.

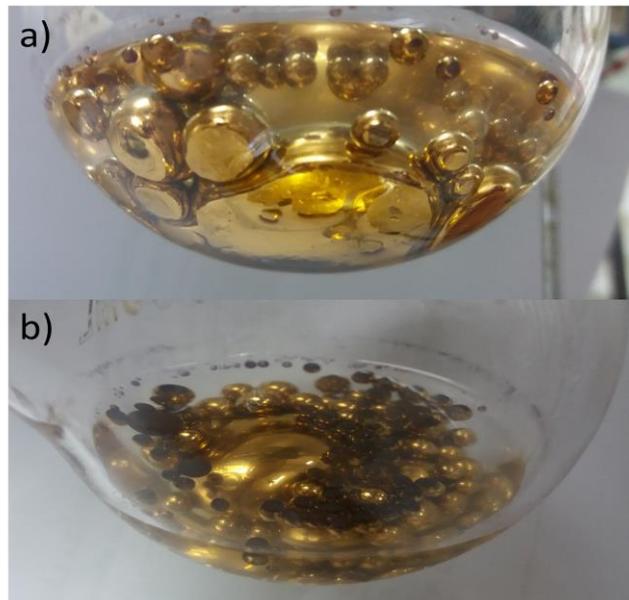
Figura 18- Imagem do sistema reacional após a adição do agente redutor.



Fonte: autora da tese, 2017.

Assim que o sistema reacional foi desligado, após aproximadamente 20 h de reação, houve a formação de uma película com brilho metálico, sugerindo o acoplamento eletrônico das AuNPs na interface água/óleo (WANG, 2005), como podemos observar na Figura 19.

Figura 19- Imagem da formação de uma película de nanopartículas de ouro na interface água/óleo após a reação: a) vista por baixo do balão de reação e b) vista por cima do balão de reação.



Fonte: autora da tese, 2017.

De acordo com Xu e colaboradores (2016), matrizes de nanopartículas de metal bidimensional são normalmente construídos em interfaces líquido-óleo, modificando as superfícies das nanopartículas constituintes de modo que promovam a sua automontagem. A adsorção de NPs na interface líquido-líquido é normalmente controlada cineticamente baseando-se no movimento Browniano das NPs. Assim, uma força externa, no caso agitação é aplicada para acelerar este processo, trazendo as NPs para a interface (XU et al., 2016), o que pode ter ocorrido com o nosso coloide, pois a formação do filme metálico iniciou-se logo após o desligamento do sistema reacional, conseqüentemente, da agitação.

A formação de NPs na interface água-óleo está diretamente relacionada a um ângulo de contato em torno de 90° entre as NPs e a interface, que é determinada pelos grupos terminais de seus ligantes (WANG, 2005). Reincke e colaboradores (2004) demonstraram que a adição de etanol conduz a um ângulo de contato próximo de 90° para AuNPs estabilizadas por citrato, empurrando-as assim para a interface hexano/água (REINCKE et al., 2004; WANG, 2005). Esse fator também pode ter influenciado na nossa reação, uma vez que existe etanol no meio reacional.

A película foi desfeita após a separação das fases, o coloide voltou a apresentar a coloração azul escuro, característico de dispersões coloidais de ouro com aproximadamente 100 nm (WANG, 2005; HAISS et al., 2007; MORAIS et al., 2013).

Após os procedimentos descritos e a finalização da síntese, o material foi levado para as devidas caracterizações para confirmação de forma e tamanho.

4.2 Preparação dos Substratos

Uma vez caracterizado o coloide obtido, seu respectivo substrato pode ser construído, pela imobilização, em óleo de mamona hidrogenado, do coloide precursor líquido à base de nanopartículas de ouro dispersas em óleo de mamona, gerando um material com aspecto de cera e coloração azul. Assim como também foi construído um substrato sem as nanoestrelas de ouro, apenas com a mistura entre óleo de mamona e óleo de mamona hidrogenado, neste caso um material também com aspecto de cera, mas de coloração amarelada.

Os materiais foram testados e seus resultados serão discutidos nas próximas seções. Os substratos obtidos também foram submetidos à caracterização por espectroscopia na região do UV-vis.

4.3 Técnicas de Caracterização das Nanopartículas de Ouro

Para a investigação das propriedades eletrônicas de nanopartículas metálicas pode ser utilizada a Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta-vísivel, isto porque alguns metais, como Au e Ag, na escala nanométrica apresentam uma banda de absorção característica de seu plásmon de superfície nesta região do espectro eletromagnético. Outra técnica essencial para a caracterização de nanomateriais é a Microscopia Eletrônica de Transmissão, a qual possibilita a obtenção de imagens diretas das nanopartículas, e a partir de uma ampla amostragem, é possível obter uma boa base da distribuição de seus tamanhos (OTUBO, 2005).

Estas técnicas foram utilizadas para a caracterização do coloide obtido e seus resultados estarão discutidos nas próximas seções.

4.3.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)

Para a caracterização das nanopartículas de ouro a partir do coloide obtido e também das mesmas após a preparação do substrato, foram registrados os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível dos materiais, utilizando como linha de base o espectro do óleo de mamona puro, este transparente na região em estudo do espectro eletromagnético, entre comprimentos de onda de 400 a 900 nm (DA SILVA, 2009).

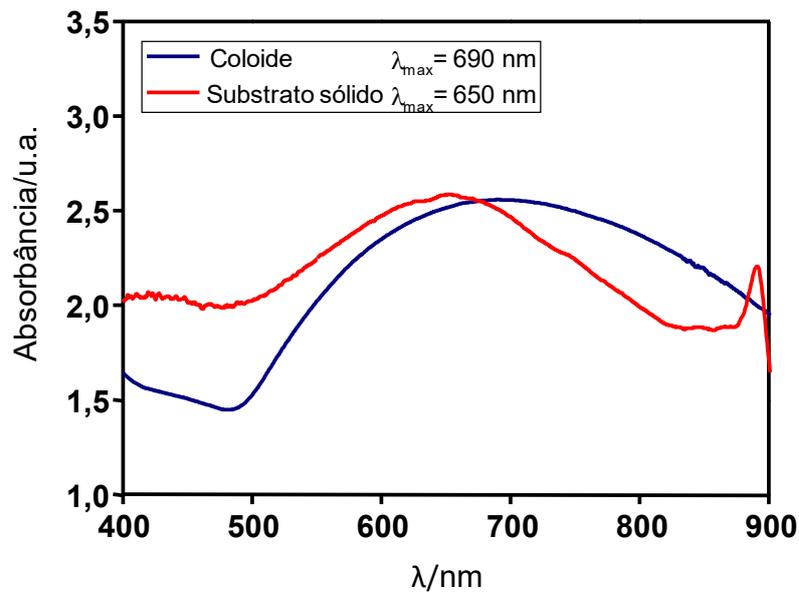
Na Figura 20, estão demonstrados os espectros de absorção do coloide obtido e do substrato com AuNPs sobrepostos. Como pode ser observado, existe a presença de uma banda alargada de absorção máxima em aproximadamente 690 nm no espectro do coloide e em 650 nm no espectro do substrato, referente à absorção do plásmon das nanopartículas, o que pode caracterizar nanopartículas de ouro com diâmetro de aproximadamente 100 nm (LINK, 2000), de acordo com Morais et al. (2013) e Haiss et al. (2007). De acordo com Link e El-Sayed (2000) e Pereira (2009), à medida que o tamanho das NPs aumenta, a polarização da nuvem eletrônica pelo campo elétrico deixa de ser homogênea, causando a excitação de outros modos multipolares. A ressonância destes modos ocorre em comprimentos de onda maiores e promove um alargamento da banda de absorção do plásmon.

Em NPs com estruturas complexas tais como nanoestrelas e nanoanéis, os modos LSPR são o resultado da hibridação (mistura) de plásmos de modos individuais, onde a combinação dos dois modos, em diferentes frequências, produz modos com frequência inferior e modos de maior frequência que as iniciais (LANGER, 2015).

Assim, o aspecto da banda larga pode sugerir que as NPs obtidas não são totalmente simétricas, uma vez que a banda alargada pode sugerir uma soma de várias outras bandas menores. Isso nos leva a acreditar na formação de nanopartículas anisotrópicas.

No espectro de absorção obtido após a formação do substrato podemos observar uma banda também alargada. Houve um pequeno deslocamento da banda em relação à banda no coloide original, mostrando que o substrato obtido pode possuir ainda as mesmas características da dispersão coloidal inicial.

Figura 20- Espectros de Absorção no Ultravioleta-Visível do coloide e do substrato.



Fonte: autora da tese, 2017.

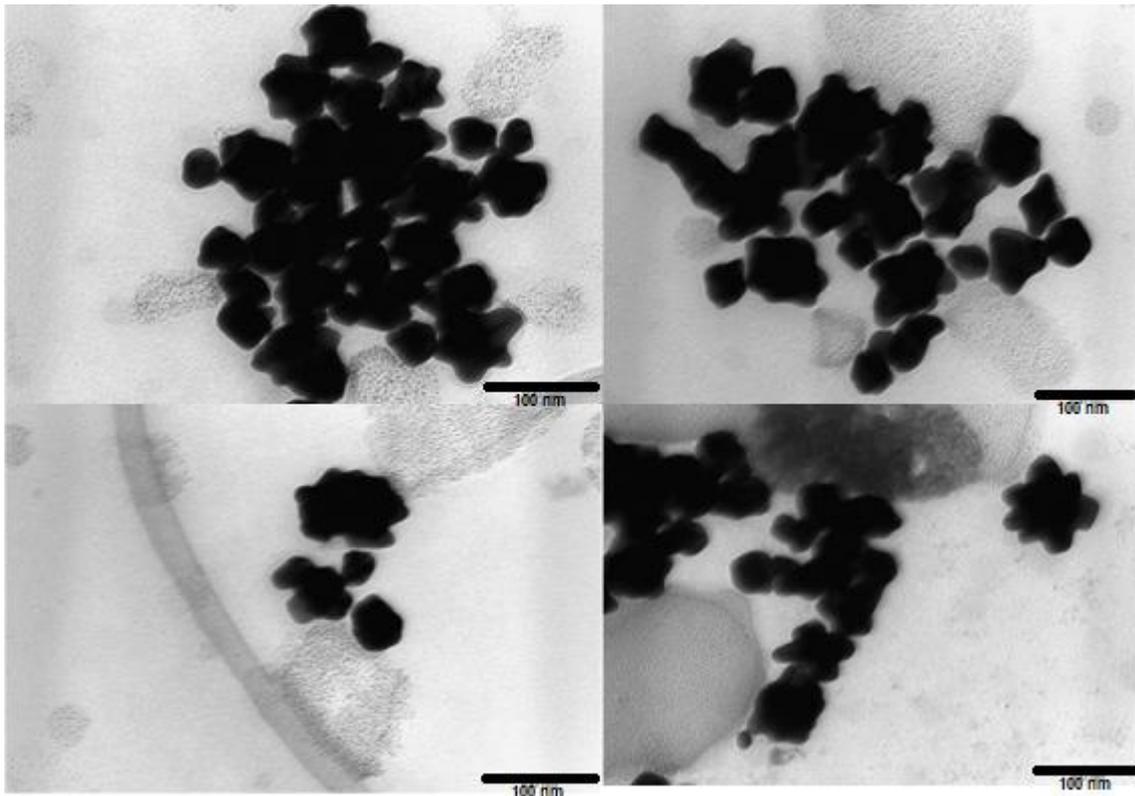
O tamanho e a forma das nanopartículas obtidas puderam ser verificados através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão, como discutida na próxima seção.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a verificação da forma e do tamanho das nanopartículas presentes no coloide obtido, foram realizadas análises pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão e suas imagens resultantes estão mostradas na Figura 21.

Devido a dificuldades na preparação da amostra após a imobilização das AuNPs, não foi possível a obtenção de imagens através do MET do substrato pronto.

Figura 21- Imagens de MET do coloide obtido.



Fonte: autora da tese, 2017.

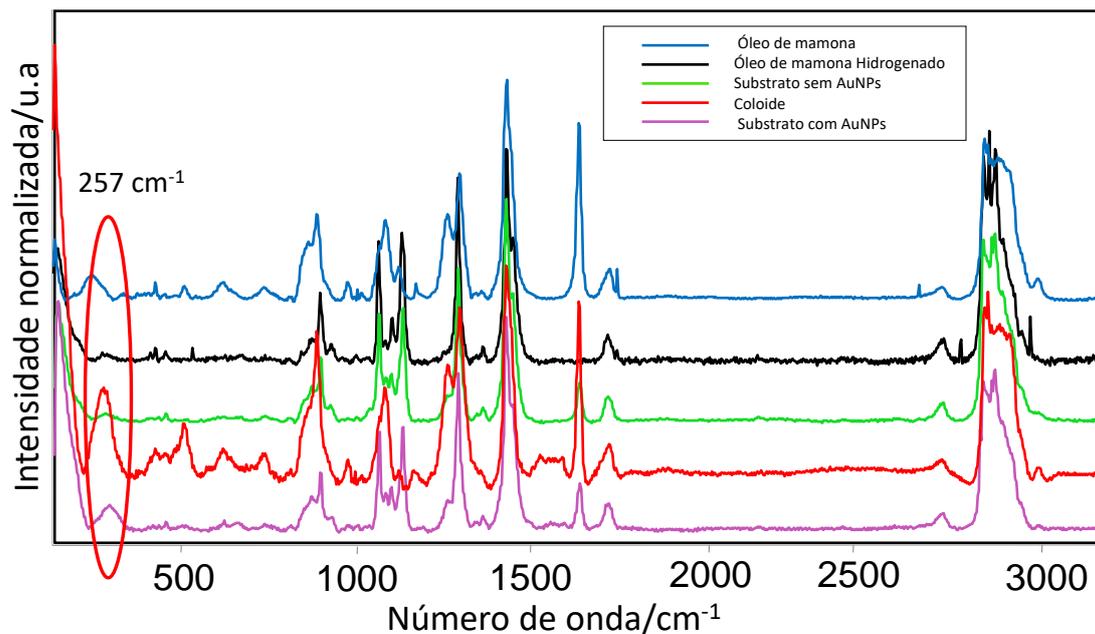
A Figura 21 mostra uma imagem típica das nanopartículas, obtidas através da análise de MET do coloide, onde podemos observar que as AuNPs obtidas apresentaram um formato irregular, com algumas pontas, e com tamanho médio de 98 ± 25 nm. E esse tipo de nanopartícula pode ser chamada de nanoestrelas. De acordo com Feng Hao e colaboradores (2007), estas nanopartículas são de grande interesse para a aplicação em SERS, uma vez que o aumento do campo elétrico local nas pontas de uma nanoestrela pode ser mais intenso que em uma nanopartícula esférica ou em uma ponta de estrela individual o que pode gerar uma maior intensificação nas bandas Raman de moléculas adsorvidas ao material (HAO et al., 2007).

4.4 Teste do Substrato

Inicialmente foram analisados os espectros Raman dos materiais, antes dos testes de SERS, substratos com e sem AuNPs, assim como o coloide, o óleo de mamona e o óleo de mamona hidrogenado, por Microscopia Raman e seus respectivos espectros estão demonstrados na Figura 22. Nesta, podemos observar

as bandas referentes ao óleo de mamona em todos os substratos e uma banda referente ao plásmon de superfície das AuNPs presentes, em aproximadamente 257 cm^{-1} , apenas no substrato com nanopartícula de ouro e no coloide, o que já era de se esperar, uma vez que de acordo com Hao e colaboradores (2007), nanoestrelas, como as presentes no nosso substrato, contam com plásmon de superfície com maior poder de intensificação, devido a presença de pontas, do que nanoesferas, como já mencionado.

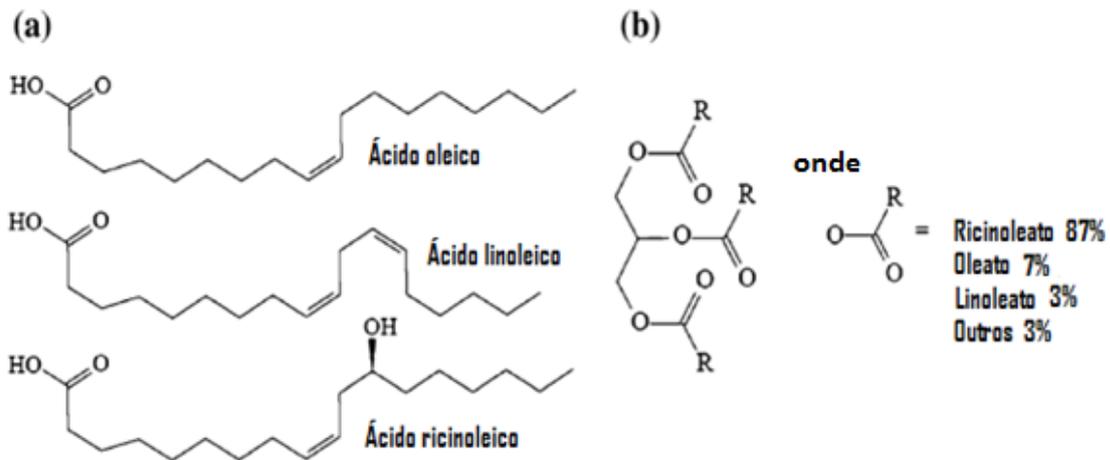
Figura 22- Espectros Raman dos materiais: substratos com e sem nanopartículas de ouro; coloide; óleo de mamona; e óleo de mamona hidrogenado.



Fonte: autora da tese, 2017.

A presença da banda referente ao plásmon de superfície indica que o material pode apresentar atividade SERS, no caso, tanto o substrato (quanto o coloide) pode apresentar esta atividade. O substrato branco foi usado em todas as análises apenas como padrão de comparação, já que não possui nanopartículas, assim não poderia ser SERS-ativo, o que foi demonstrado também pela inexistência da banda em 257 cm^{-1} .

Figura 23- Estrutura molecular dos ácidos (a) oleico, linoleico e ricinoleico, componentes do óleo de mamona e (b) estrutura geral de um triglicerídeo com as composições referentes ao óleo de mamona.



Fonte: Adaptado de SILVA et al. (2008).

Uma vez que o óleo de mamona é composto principalmente pelo ácido ricinoleico (Figura 23), cerca de 90% de teor (GUI, 2008; MUTLU, 2010), pôde-se tentar uma atribuição vibracional para as bandas observadas nos espectros a partir da estrutura desse ácido e de acordo com dados da literatura. As descrições e atribuições-tentativa para cada banda mostrada nos espectros da Figura 22 estão relacionadas na Tabela 4, assim como suas intensidades relativas, conforme indicações da literatura (DA SILVA, 2000; BEATTIE, 2004; OLIVEIRA, 2006; JACINTHO, 2007; DRUMMOND, 2008; FERREIRA, 2008; JACINTHO et al., 2009).

Tabela 4- Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos espectros dos substratos com e sem nanopartículas e do coloide, relacionados principalmente à estrutura do ácido ricinoleico.

Número de onda (cm ⁻¹)	Intensidade relativa*	Atribuição**
3008	sh	ν =C-H + ν C-H (CH ₂ e/ou CH ₃)
2882	vs	ν C-H (CH ₂ e/ou CH ₃) as
2854	vs	ν C-H (CH ₂ e/ou CH ₃) sim
2726	mw	ν C-H (CH ₂ e/ou CH ₃)
1742	w	ν C=O + δ C-H (CH ₃)
1654	mw	ν C=C <i>cis</i>
1561	vw	ν C-CO as
1440	s	ν C-CO sim + δ C-H (CH ₂)
1392	vvw	τ C-H (CH ₂)
1367	s	τ C-H (CH ₂)
1297	ms	δ C-O + τ C-H (=CH)
1261	sh	δ C-O + τ C-H (=CH)
1132	mw	ν C-O + ν C-C
1062	mw	ν C-OH + δ C-O
891	vw	γ C-H (CH ₃) + γ =C-H
257	ms	ν Au-Au

Fonte: autora da tese, 2017.

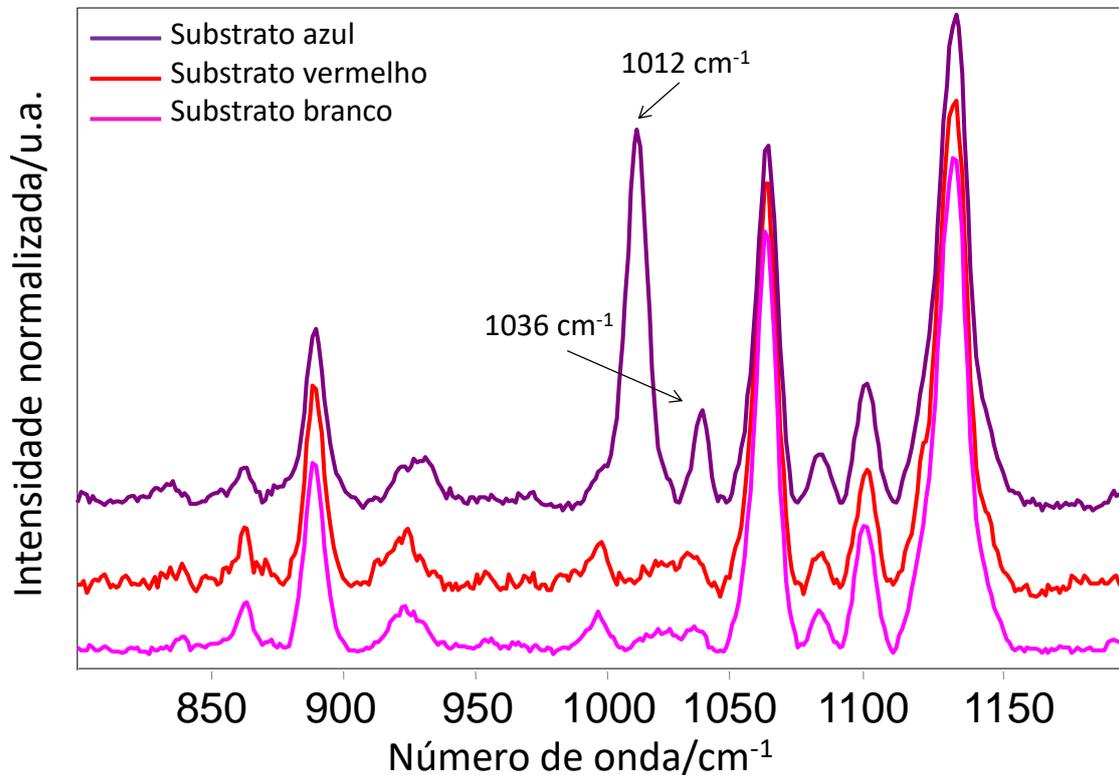
Nota: * Intensidades relativas: vvw - muitíssimo fraco; vw - muito fraco; w - fraco; mw - médio/fraco, m - médio, ms - médio/forte, s - forte, vs - muito forte, sh - ombro.

** ν – estiramento, δ – deformação angular, τ – torção, γ - deformação fora do plano.

Os primeiros testes para saber se nosso substrato apresentava atividade SERS, foi em um trabalho anterior do grupo (PACHECO, 2012), onde foi analisado dois tipos de substratos, um contendo AuNPs em forma esférica, de coloração vermelha, e outro em forma de estrela, de coloração azul. Ambos substratos foram imersos em soluções com diferentes concentrações de piridina. Neste trabalho foi observada a intensificação das bandas Raman referentes a esta molécula em 1012 cm⁻¹ e 1036 cm⁻¹ (HUANG et al., 2011; POTAPKINA et al., 2011), que são atribuídas aos modos de respiração e deformação simétrica do anel, respectivamente (OLIVEIRA, 2006), com concentração de até 1x10⁻⁴ mol L⁻¹, somente no substrato com AuNPs na forma de estrelas. Isso tudo, mostrou que o substrato, contendo AuNPs em forma de

estrelas, era realmente SERS-ativo (PACHECO, 2012). Os resultados deste trabalho anterior podem ser observados nas Figura 24 e 25, a seguir.

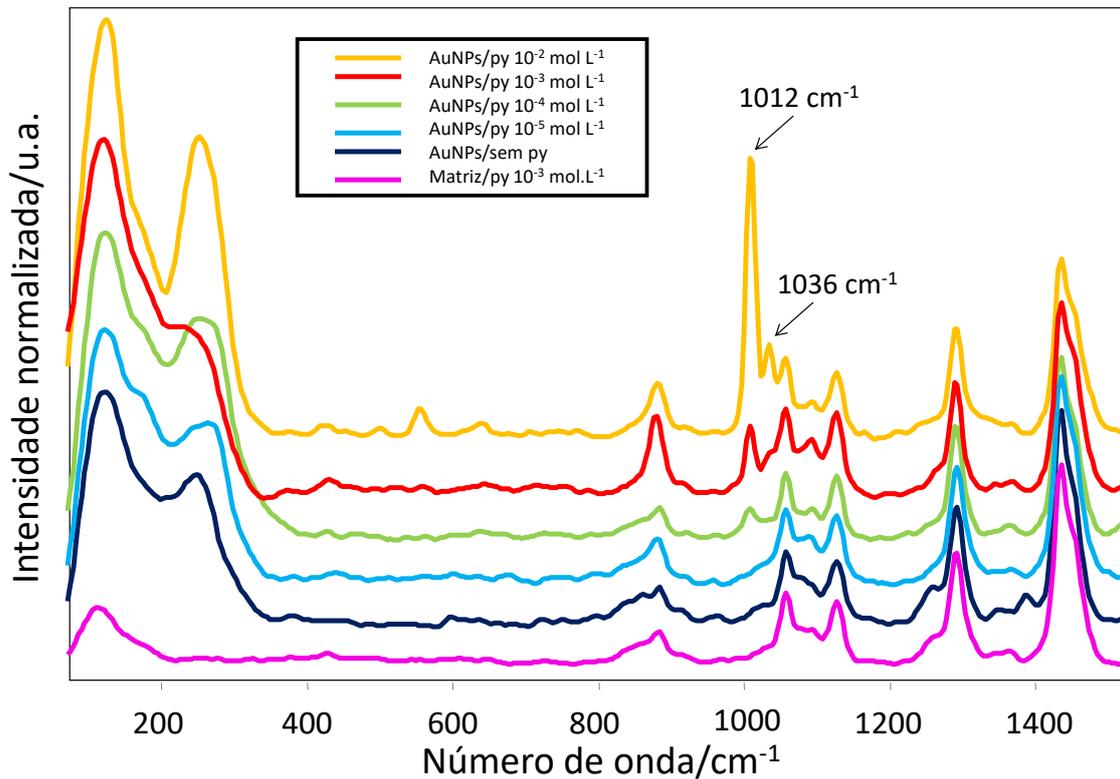
Figura 24- Espectros Raman obtidos dos substratos após imersão em solução de piridina 0,1 mol L⁻¹.



Fonte: PACHECO (2012).

Os espectros Raman obtidos estão mostrados na Figura 24, onde podemos observar a presença das bandas referentes à piridina, em concentração de 0,1 mol L⁻¹. Observa-se que somente no espectro obtido do substrato com nanopartículas de ouro na forma de estrelas ocorre a presença destas bandas, indicando uma intensificação das mesmas, pois se compararmos com o substrato com nanoesferas e no padrão (branco), nesta mesma concentração, não apresentou nenhum sinal de piridina. Este fato era esperado, uma vez que o substrato produzido demonstrou a banda referente ao plásmon de superfície bastante intensa.

Figura 25- Espectros FT-Raman obtidos dos substratos com nanoestrelas de ouro (azul) após imersão em soluções de piridina com diferentes concentrações, substrato com nanoestrelas sem solução de piridina e substrato sem nanoestrelas (branco) com solução de piridina $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: PACHECO (2012).

Podemos observar na Figura 25 que as bandas referentes à piridina mostraram-se intensificadas com uma concentração de até $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, se compararmos ao espectro de uma solução de piridina de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em um substrato sem AuNPs, também na mesma figura.

A Figura 25 mostra também o espectro de um substrato com AuNPs sem ter sido imerso na solução de piridina. Podemos ver claramente que a banda referente ao plásmon de superfície, em aproximadamente 257 cm^{-1} , é deslocada à medida que a concentração de piridina no meio varia, indicando a interação direta da piridina com a superfície das nanopartículas.

Com o aumento da concentração de piridina, pode-se observar o alargamento da banda referente ao plásmon de superfície, que provavelmente está atribuída às ligações Au-N + Au-Au. Com a maior concentração analisada, $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, podemos perceber que a banda tornou-se novamente estreita, porém com uma

maior intensidade e com um pequeno deslocamento para um maior número de onda, que pode estar atribuída apenas a ligação Au-N.

Estes e outros estudos mostraram que o nosso substrato promovia o efeito SERS, ou seja, era um substrato SERS-ativo, mas seriam necessários outros estudos mais aprofundados e cálculos do fator de intensificação para avaliar esta atividade e possíveis aplicações do substrato em diversas áreas. E estes foram os principais objetivos do nosso trabalho atual.

É importante salientar que os espectros mostrados na Figura 25 foram obtidos em outro tipo de equipamento, localizado no Laboratório de Materiais e Combustíveis da Universidade de Brasília, um espectrômetro com Transformada de Fourier EQUINOX 55 da Bruker Optics. Este espectrômetro possui um acessório para FT-Raman que usa um detector de germânio, o qual é refrigerado por nitrogênio líquido. Neste caso, o *laser* utilizado foi o de comprimento de onda de 1064 nm (Nd:YAG) e os espectros foram coletados pelo método de retroespalhamento, com 256 acumulações, potência do *laser* de 150 mW e resolução de 8 cm^{-1} .

Para adequar a realidade do nosso grupo, que possui um microscópio Raman que opera de maneira diferente de um FT-Raman, como já mencionado, buscamos desenvolver uma estratégia que permitisse uma adequada avaliação e para tanto, selecionamos uma região da amostra e realizamos análises em aproximadamente 150 pontos diferentes, método de mapeamento. Assim, para análise dos resultados foram utilizados a média dos espectros a partir dos espectros registrados em cada um dos 150 pontos.

4.4.1 Escolha das moléculas sonda

Neste trabalho foram escolhidas cinco moléculas sonda: 4-Aminotiofenol, Benzotiofenol, Tiofenol, Cisteamina e Cisteína para testar o potencial de aplicação do nosso substrato.

4.4.1.1 4-Aminotiofenol (4-ATP)

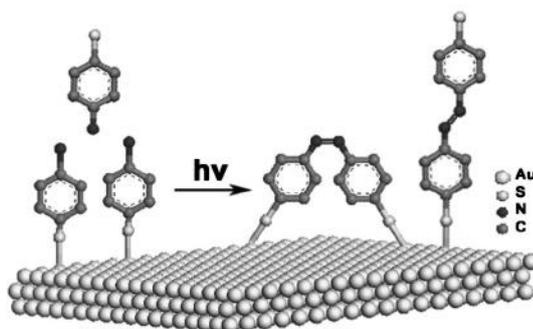
A molécula do 4-Aminotiofenol foi escolhida como molécula sonda Raman ativa, pois tem sido amplamente utilizada em SERS devido à sua forte afinidade química pelo ouro e prata e por exibir comportamento SERS específico em certas circunstâncias (FIRKALA et al., 2013).

Inicialmente, a razão principal para que a 4-ATP se tornasse cada vez mais importante em estudos de SERS é que suas bandas Raman “tipo-b2”, por exemplo, em 1140, 1384 e 1432 cm^{-1} tem sido consideradas como evidência crucial do efeito de transferência de carga em SERS (YE et al., 2012).

Em seguida, vários relatos foram feitos na literatura que evidenciavam outra explicação para o aparecimento das bandas SERS chamadas de modos-b2 do 4-ATP.

Firkala et. al. (2013) relataram que para que ocorra a intensificação SERS dos chamados modos b2 do 4-ATP, é necessário que certa quantidade da molécula sonda na forma oxidada deve estar presente, suportando a ideia de que ocorra a formação de uma ponte-azo na superfície metálica, formando um novo composto, 4,4-dimercaptoazobenzeno (DMAB), durante a medida de SERS, como mostrado na Figura 26 (CAO, 2013; FIRKALA et al., 2013).

Figura 26- Ilustração esquemática da transformação de 4-ATP em DMAB, nas formas cis e trans, na superfície do ouro durante as medidas de SERS.



Fonte: CAO (2013).

4.4.1.2 Benzotiofeno (BTF) e Tiofeno (TF)

A escolha do BTF e do TF como molécula sonda se deram porque, além destas moléculas possuírem afinidade pela superfície metálica, o que é primordial para sua utilização em SERS, as mesmas podem estar presentes em combustíveis fósseis e sua quantificação é importante.

Cada vez mais atenção vem sendo dada a utilização de óleos pesados e seus resíduos, devido à diminuição na oferta mundial de petróleo leve. No entanto, esses óleos pesados e seus resíduos, muitas vezes contêm quantidades significativas de alcatrens (betume), isto é, compostos sulfurados e organometálicos, que são fontes

de poluição do ar durante a combustão. Assim, a conversão de óleos pesados para produtos líquidos mais leves e mais valiosos e a remoção de suas impurezas é necessário (HUO et al., 2015).

Atualmente, o método mais utilizado para remoção de enxofre é a hidrodessulfurização (HDS). Estudos mostraram que a HDS em condições alcalinas é muito efetiva, no entanto, o teor de enxofre não pode ser reduzido para menos que 3% em betume, possivelmente pela formação de Benzotiofeno, sendo um dos compostos mais difíceis de serem dessulfurizados (HUO et al., 2015).

Huo e colaboradores (2015) utilizaram Espectroscopia Raman *in situ* para investigar um mecanismo de dessulfurização do BTF, mostrando que a Espectroscopia Raman é uma forma efetiva de monitorar as alterações estruturais que ocorrem durante as reações de dessulfurização (HUO et al., 2015).

Como a concentração máxima permitida de enxofre em combustíveis vem diminuindo com o passar dos anos, devido ao crescimento da consciência ambiental no mundo, são necessários o desenvolvimento de técnicas de detecção e/ou monitoramento cada vez mais sensíveis.

De acordo com a Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) nº 40 de 25 de outubro de 2013, no Brasil, o teor de enxofre aceito em gasolinas é de no máximo 50 mg kg^{-1} . Já através da Portaria nº 03 de 27 de janeiro de 2016, o teor de enxofre permitido em óleos combustíveis é de até 3% em massa. As portarias citadas também estabelecem os métodos que devem ser utilizados para a determinação de enxofre, nos dois casos (BRASIL, 2013; BRASIL, 2016).

Para a determinação de enxofre em gasolina devem ser utilizados os métodos determinados pelo *Institute of Petroleum* – IP, indicados pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM): D2622 – Espectrometria de Raio X; D3120 – Microcoulometria Oxidativa; D 5453 – Fluorescência no Ultravioleta; D6920 – Detecção Eletroquímica; D7039 – Espectrometria de Fluorescência de Raio X com Dispersão por Comprimento de Onda Monocromática; D7220 - Espectrometria de Fluorescência de Raio X - Energia Dispersiva Monocromática (BRASIL, 2013).

Já para a detecção de enxofre em óleos combustíveis, podem ser empregadas as normas da Associação Brasileira de Normas Técnica (ABNT) e da ASTM: NBR 15546 – Alta temperatura - Detecção com Infravermelho; D 1552 – Método de Alta Temperatura; D2622 - Espectrometria de Raio X; D4294 - Espectrometria de

Fluorescência de Raio X - Energia Dispersiva; D5453 - Fluorescência no Ultravioleta (BRASIL, 2016).

4.4.1.3 Cisteamina e Cisteína

E por fim, escolhemos cisteamina e cisteína como moléculas sonda para possíveis aplicações na área bioquímica (RIAUBA et al., 2006; ARIAS et al., 2015).

A cisteamina é uma pequena molécula bifuncional que pode ser utilizada como um ligante quelante na química de coordenação, bioquímica, e para construção de monocamadas automontadas em superfícies metálicas. O grupo tiol, SH, da molécula forma uma forte ligação química metal-enxofre quando adsorvida na superfície de ouro, prata e cobre, enquanto o grupo NH₂ interage com íons, moléculas orgânicas e proteínas em fase de solução usada para preparar estruturas moleculares com propriedades específicas (RIAUBA et al., 2006).

Já a cisteína é um aminoácido não essencial que pode ser encontrado na maior parte das proteínas. Também é uma molécula de grande interesse bioquímico, uma vez que é uma molécula precursora de numerosos metabólitos que contém enxofre e que são necessários para o desenvolvimento da vida (ARIAS et al., 2015).

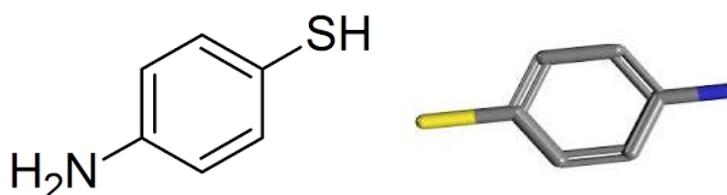
Logo, é de importante interesse estudar as interações que podem ocorrer entre estes tipos de moléculas, até mesmo suas interações com outras moléculas orgânicas e/ou inorgânicas.

4.4.2 As moléculas sonda

4.4.2.1 4-Aminotiofenol (4-ATP) como molécula sonda

Com o intuito de testar o nosso substrato com umas das moléculas hoje mais utilizada em estudos de SERS, 4-ATP (Figura 27), foram realizados procedimentos semelhantes aos realizados anteriormente.

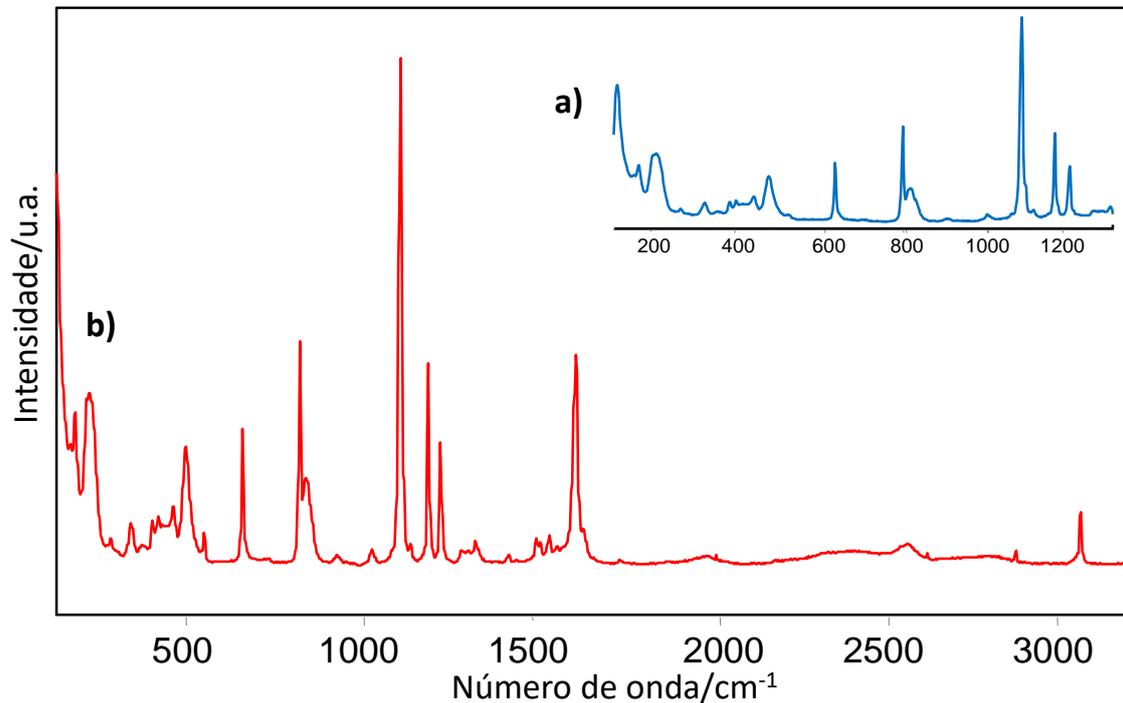
Figura 27- Estrutura molecular do 4- aminotiofenol (4-ATP).



Fonte: Adaptação a partir de PUBCHEM (2016) e VWR (2016).

A Figura 28 mostra o espectro Raman do 4-ATP puro, onde podemos observar suas bandas Raman características.

Figura 28- Espectro Raman do 4-ATP puro (sólido), onde (a) região de maior interesse em nosso estudo e (b) espectro completo.



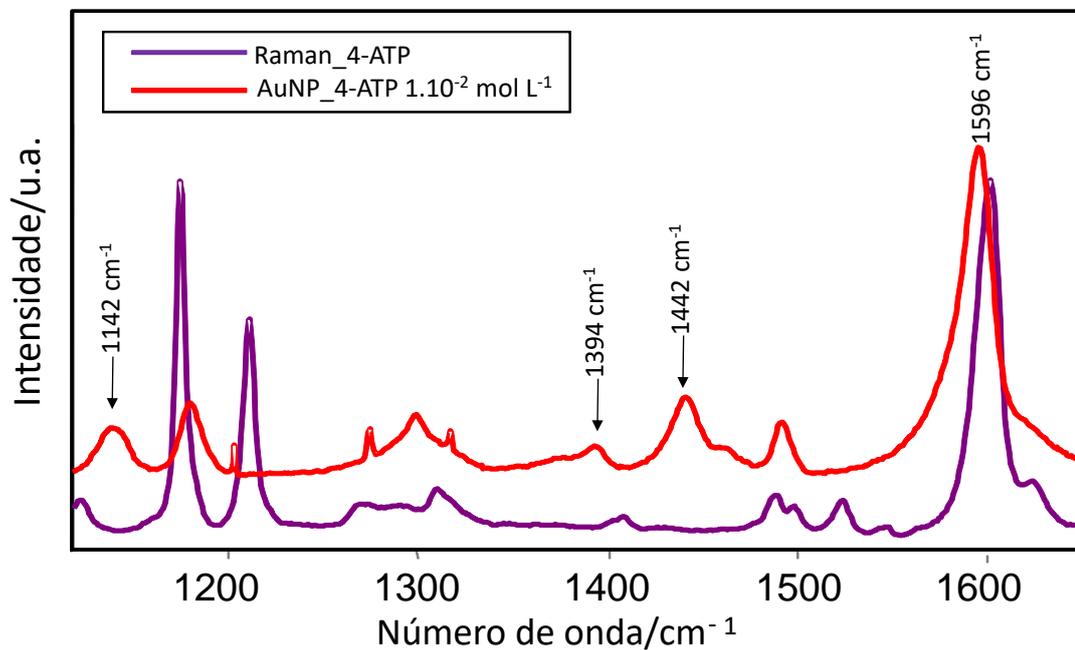
Fonte: autora da tese, 2017.

Os aminotiofenóis são frequentemente estudados como moléculas sonda em SERS, em particular, a molécula do 4-ATP é muito utilizada em estudos de SERS, pois ela além de possuir boa afinidade ao ouro, é frequentemente usada como molécula de junção e também como bloco de construção em automontagem de monocamadas. O 4-ATP exibe um comportamento específico e diferenciado em determinadas circunstâncias (FIRKALA et al., 2013). Este comportamento particular tem sido explicado pela formação de outra molécula, 4,4-dimercaptoazobenzeno (DMAB), durante os experimentos SERS do 4-ATP através de reações catalíticas fotoinduzidas na superfície do metal, fazendo com que apareçam bandas em 1140, 1390, 1432 cm^{-1} , as quais não são observadas nos espectros Raman do 4-ATP e não podem ser estimadas através de simulações calculadas (JIANG et al., 2016).

A Figura 29, a seguir, mostra os espectros Raman e SERS do 4-ATP obtidos com o nosso substrato, onde podemos observar o aparecimento de bandas características da formação da molécula de DMBA em 1142, 1394, 1442 cm^{-1} que

podem ser atribuídas aos modos de estiramento de N-N (grupo azo) do produto de acoplamento (JIANG et al., 2016) e 1596 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento -C=C- (CANPEAN, 2012).

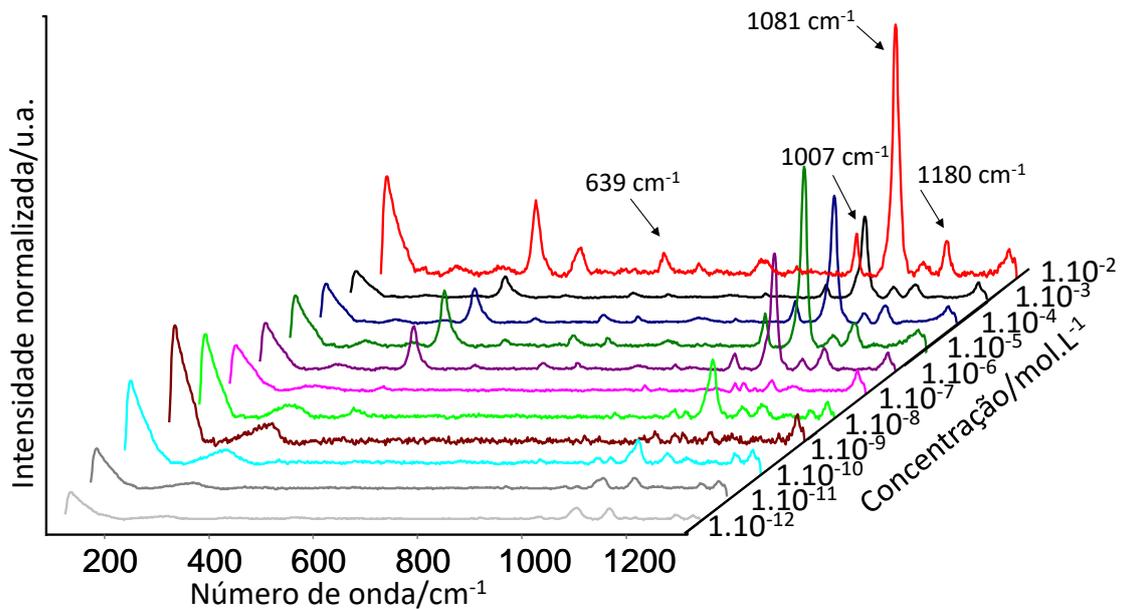
Figura 29- Espectros Raman e SERS do 4-ATP.



Fonte: autora da tese, 2017.

Para o estudo SERS com diferentes concentrações de 4-ATP, fomos mais adiante em relação aos estudos das moléculas anteriores, uma vez que o nosso substrato conseguiu promover uma ótima intensificação nas bandas Raman desta molécula, isto pode ser observado na Figura 30, onde pudemos observar a intensificação das bandas do 4-ATP com até uma concentração de $1 \times 10^{-10}\text{ mol L}^{-1}$.

Figura 30- Espectros Raman obtidos do substrato após imersão em soluções de 4-ATP com diferentes concentrações.



Fonte: autora da tese, 2017.

A Figura 30 pode nos mostrar que, ainda que com alguma irregularidade nas intensidades, pudemos observar as bandas do 4-ATP no nosso substrato em baixas concentrações.

Vale ressaltar que os espectros mostrados são resultantes das médias feitas com aproximadamente 150 espectros distribuídos em uma área definida no substrato.

A partir dos espectros Raman e SERS do 4-ATP, foi construída uma tabela mostrando os números de onda relativos às principais bandas vibracionais do 4-ATP, bem como suas atribuições sugeridas, conforme indicações da literatura, Tabela 5 (KUDELSKI, 2005; CAO, 2013; FIRKALA et al., 2013; CANPEAN, 2012; BÜRGI, 2015; JIANG et al., 2016).

Tabela 5- Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos os espectros Raman e SERS do 4-ATP.

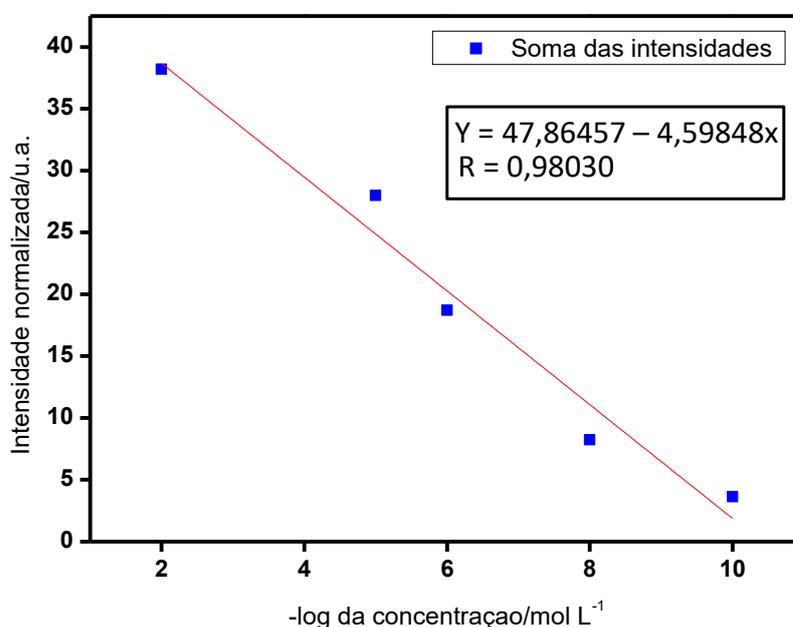
Raman (cm ⁻¹)	SERS (cm ⁻¹)	Atribuição**
-	239	ν Au-Au + ν Au-S
636	639	δ C-C-C (Anel)
802	833	δ C-C-C (Anel)
1010	1007	Respiração do anel
1093	1081	ν C-S
-	1142	ν -N=N-
1174	1180	τ C-H
1209	-	ν C-C
-	1394	ν -N=N-
-	1442	ν -N=N-
1601	1596	ν C=C

Fonte: autora da tese, 2017.

Nota: ν – estiramento, δ – deformação angular, τ – torção, γ - deformação fora do plano.

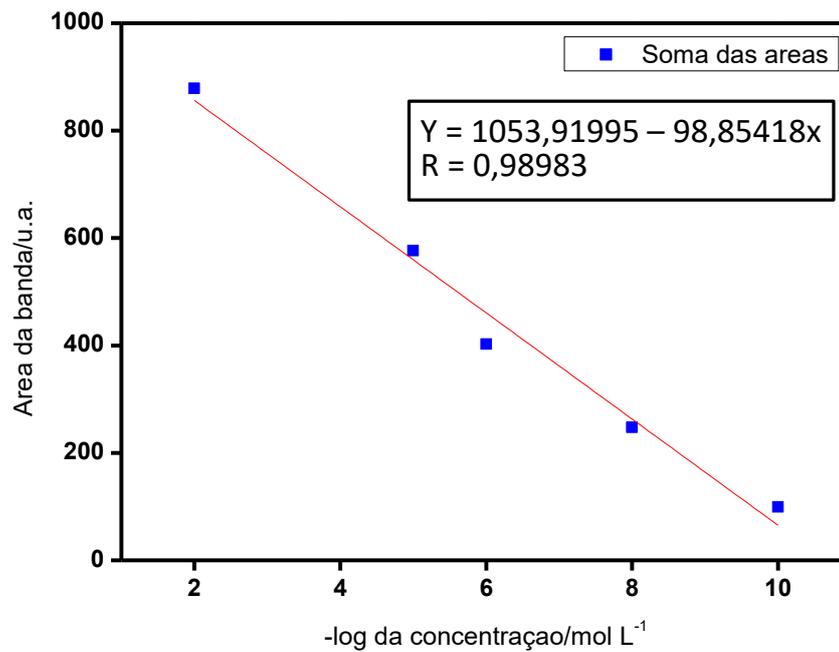
Foram construídos gráficos relacionando a soma das intensidades normalizadas das bandas SERS do 4-ATP e a soma das áreas destas bandas com a concentração, os resultados estão mostrados nas Figuras 31 e 32.

Figura 31- Gráfico da intensidade normalizada referente à soma das intensidades das bandas do 4-ATP em função de $-\log$ de sua concentração.



Fonte: autora da tese, 2017.

Figura 32- Gráfico da soma das áreas das bandas normalizadas do 4-ATP em função de $-\log$ de sua concentração.

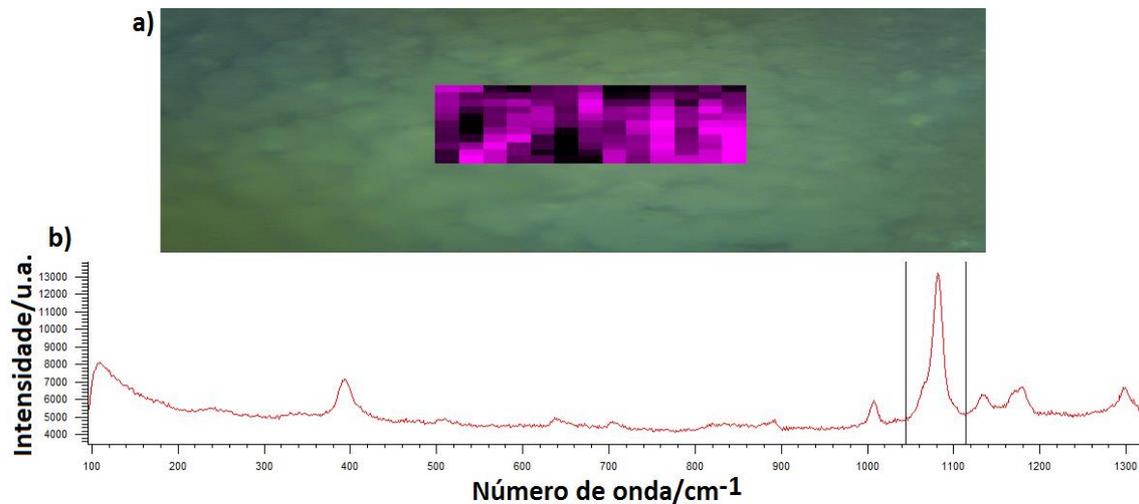


Fonte: autora da tese, 2017.

Nos gráficos mostrados nas Figuras 31 e 32 podemos observar uma tendência linear quando relacionamos a concentração com a intensidade normalizada ou com a área da banda.

A Figura 33 mostra o mapeamento de uma área do substrato em relação à banda em $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ do 4-ATP, onde podemos ver na região de cor violeta mais intensa os espectros de 4-ATP com as bandas mais intensificadas.

Figura 33- Análise do mapeamento de área no substrato após imersão em solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 4-ATP (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b).



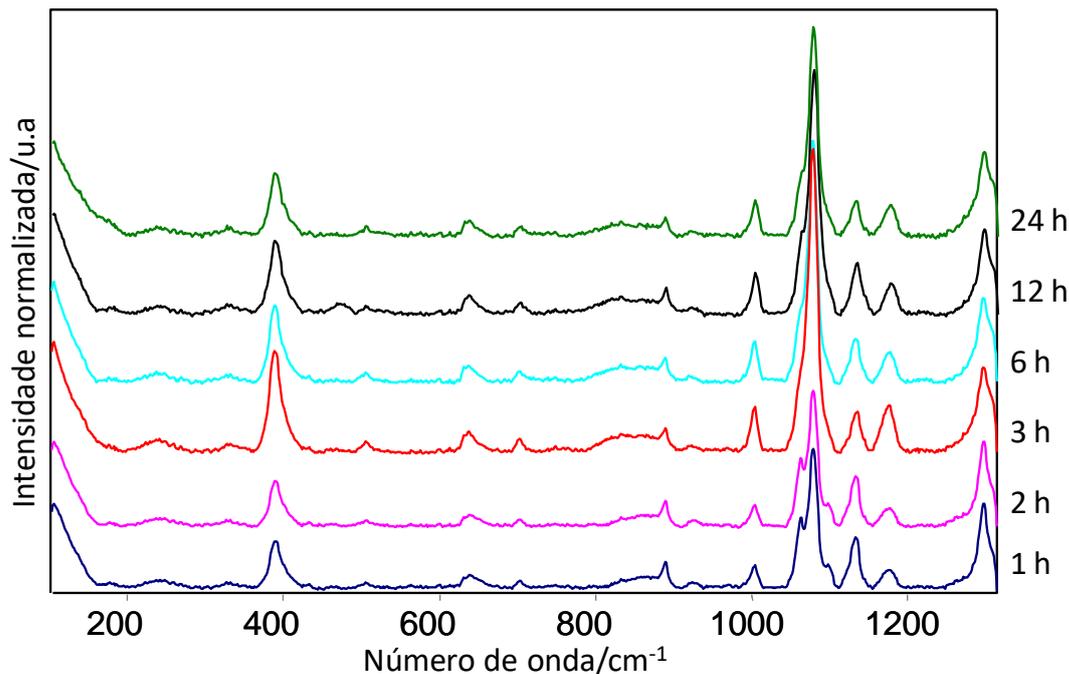
Fonte: autora da tese, 2017.

4.4.2.1.1 Estudo do tempo de imersão

A fim de avaliarmos a relação entre a intensidade dos sinais SERS do 4-ATP e o tempo de imersão do substrato na solução contendo a molécula sonda, foram realizadas análises Raman do substrato após imersão em solução de 4-ATP com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com diferentes tempos de imersão, e os resultados podem ser observados na Figura 34.

As bandas SERS relacionadas à molécula de 4-ATP puderam ser observadas nos espectros obtidos em todos os tempos estudados, porém com algumas diferenças nas intensidades.

Figura 34- Espectros SERS do 4-ATP após diferentes tempos de imersão do substrato em uma solução com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ da molécula sonda.



Fonte: autora da tese, 2017.

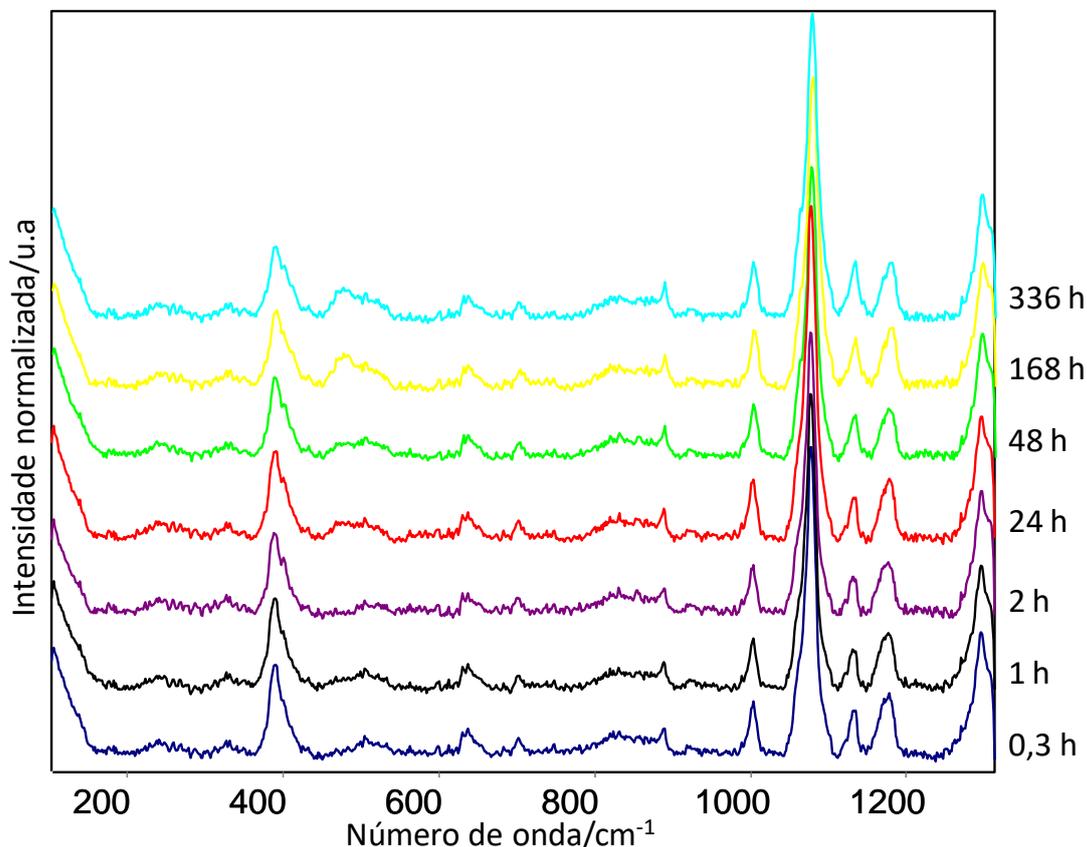
Como podemos observar, através da Figura 34, os espectros obtidos após os tempos de imersão de 1 e 2 h apresentaram menores intensificações das bandas do 4-ATP, onde podemos perceber também a presença da banda em aproximadamente 1050 cm^{-1} referente ao substrato, a mesma não foi observada nos espectros obtidos com os demais tempos de imersão devido à intensidade das bandas referentes ao 4-ATP se apresentarem maior que nos tempos inferiores e assim sobrepondo a referida banda.

Nos tempos de imersão de 3, 6, 12 e 24 h as intensidades das bandas mantiveram-se constantes, o que indica que o tempo de 3 h já poderia ter sido utilizado como padrão otimizado para nossas análises com esta molécula sonda.

4.4.2.1.2 Estudo do tempo de permanência da molécula sonda no substrato

Para avaliar o tempo de permanência da molécula sonda de 4-ATP no substrato após sua retirada da solução, foram realizadas análises do substrato após diferentes tempos, estes resultados podem ser observados na Figura 35, a seguir.

Figura 35- Espectros SERS do 4-ATP após diferentes tempos entre a retirada do substrato da solução e a análise, em uma solução com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ desta molécula sonda.



Fonte: autora da tese, 2017.

De acordo com a Figura 35, podemos observar que as análises realizadas, no mesmo ponto do substrato, e em diferentes tempos, após a retirada do mesmo da solução as intensidades das bandas referentes à molécula de 4-ATP permaneceram constantes, o que nos indica que a molécula permanece no substrato mesmo após longos tempos, no caso, a última análise foi realizada após 336 h, ou seja, duas semanas. Além disso, não houve perda na intensidade dos sinais SERS da molécula, o que pode ser um bom indicativo de estabilidade do substrato.

4.4.2.2 Benzotiofeno (BTF) como molécula sonda

Com o objetivo de testar a atividade SERS do nosso substrato para futuras aplicações na área de combustíveis, como já mencionado, foi utilizado o Benzotiofeno, estrutura mostrada na Figura 36, como molécula sonda.

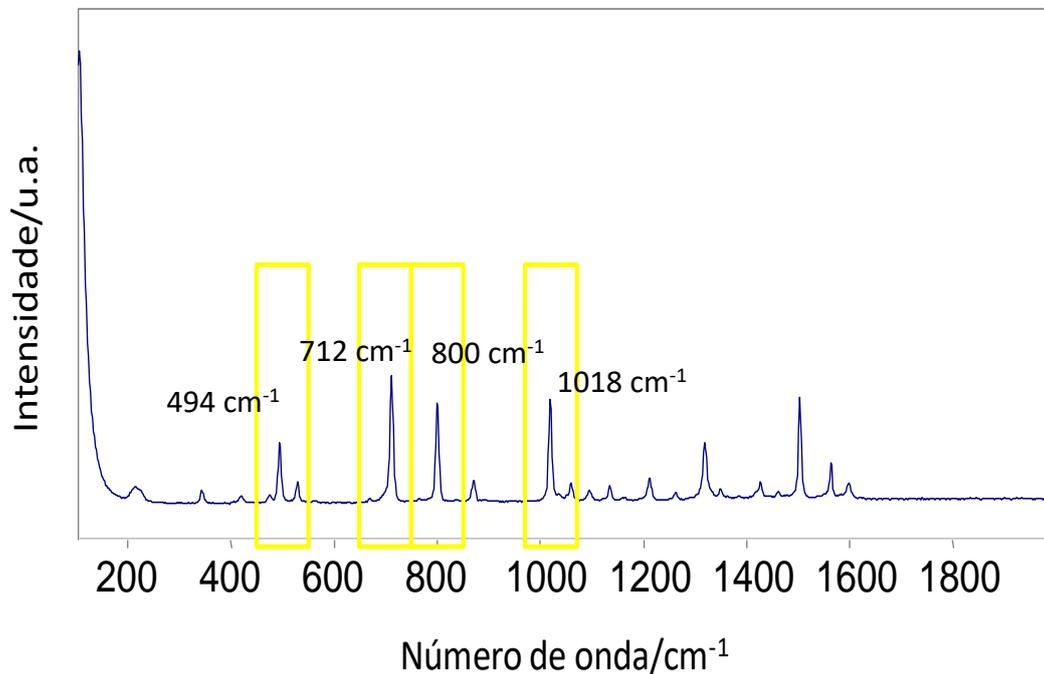
Figura 36- Estrutura molecular do benzotiofeno (BTF).



Fonte: Adaptação a partir de WIKIMEDIA (2016) e WIKIPEDIA (2016).

A Figura 37 mostra o espectro Raman do BTF puro, onde podemos observar suas bandas Raman características em aproximadamente 500 cm^{-1} , 712 cm^{-1} , 800 cm^{-1} e 1018 cm^{-1} . Estas são as bandas principais que puderam ser observadas no substrato após a análise.

Figura 37- Espectro Raman do BTF puro.

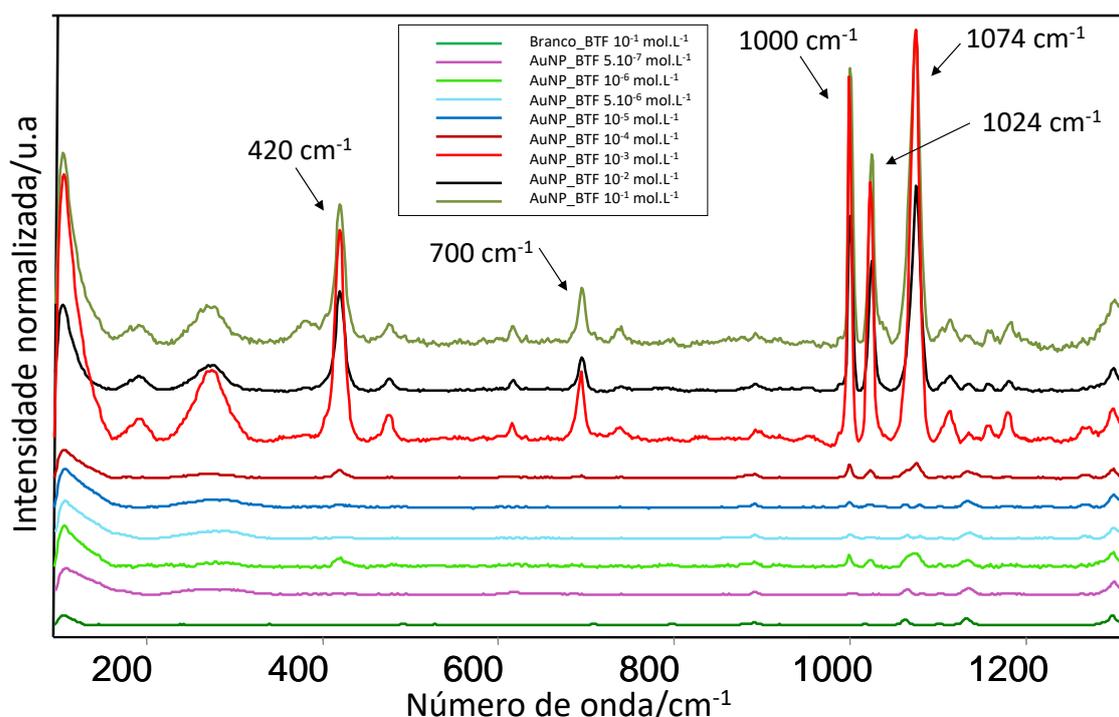


Fonte: autora da tese, 2017.

Os espectros SERS obtidos para o estudo do substrato em relação ao BTF estão mostrados na Figura 38, onde podem ser observadas as principais bandas Raman da molécula de BTF após imersão em soluções com concentrações variando de 1×10^{-1} a $5 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$.

Podemos observar, através da Figura 38 que algumas bandas referentes ao BTF foram intensificadas e também deslocadas para números de onda um pouco diferentes, o que pode indicar a interação da molécula com a superfície metálica presente no substrato.

Figura 38- Espectros Raman obtidos do substrato após imersão em soluções de BTF com diferentes concentrações (de 1×10^{-1} a 5×10^{-7} mol L⁻¹) e do substrato sem AuNPs após imersão em solução de BTF com concentração de 1×10^{-1} mol L⁻¹.



Fonte: autora da tese, 2017.

Além do deslocamento e intensificação das bandas referentes ao BTF, podemos observar também o aparecimento de duas bandas em aproximadamente 269 e 192 cm⁻¹, estas podem ser atribuídas às ligações Au-Au, referente ao plásmon de superfície, e Au-S, respectivamente.

A partir dos espectros Raman e SERS do BTF, mostrado nas figuras anteriores, podemos sugerir atribuições para suas bandas vibracionais, observando as diferenças entre as mesmas obtidas nos dois tipos de análises.

A Tabela 6 mostra os números de onda, onde aparecem as principais bandas mostradas nos espectros da molécula do BTF, assim como as suas atribuições sugeridas (KUDELSKI, 2005; FRANK, 2007; BÜRGI, 2015; HUO et al., 2015).

Tabela 6- Atribuição sugerida para as principais bandas vibracionais nos espectros Raman e SERS do BTF.

Raman (cm ⁻¹)	SERS (cm ⁻¹)	Atribuição
-	1074	ν C-S
1018	1024	δ sim do anel + τ C-H
-	1000	ν C=C (benzeno)
800	-	ν C2-S
712	700	ν C-S (C benzeno) + τ C-C-C
494	420	ν C-S-C
-	269	ν Au-Au + ν Au-S

Fonte: autora da tese, 2017.

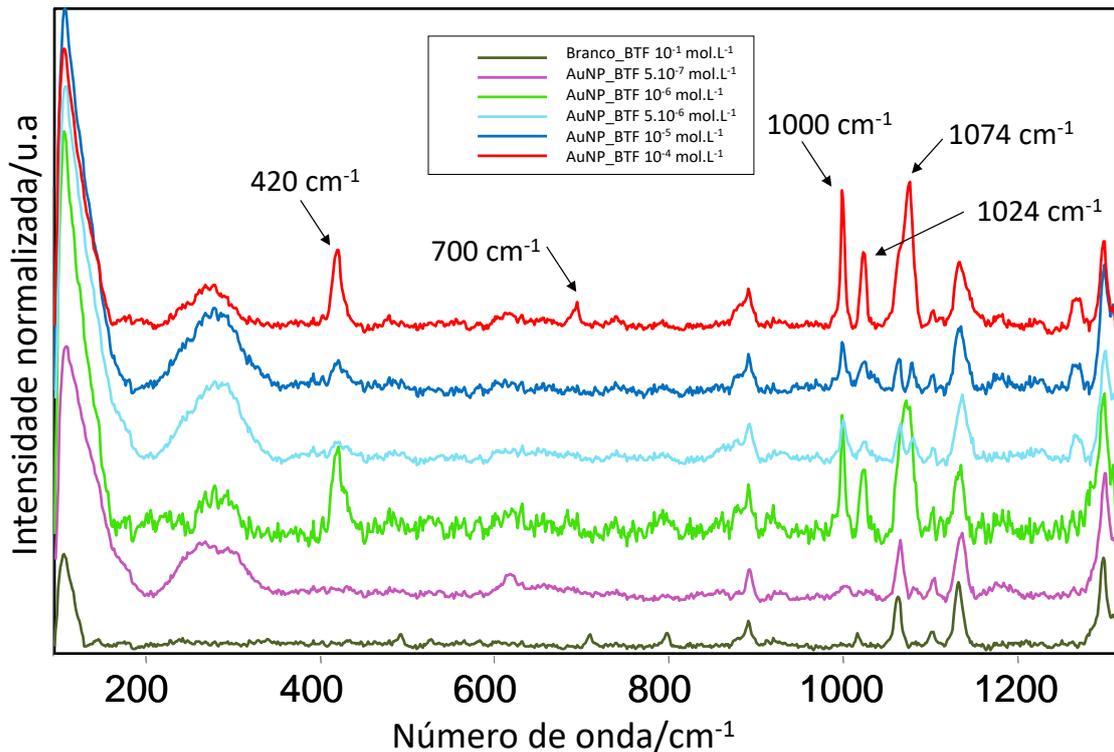
Nota: ν – estiramento, δ – deformação angular, τ – torção, γ - deformação fora do plano.

Através dos dados mostrados na Tabela 6, podemos observar que a interação das moléculas de BTF com a superfície das AuNPs, além de promover uma intensificação de algumas bandas Raman do BTF, também exibiu outras bandas que não podiam ser observadas sem a presença das AuNPs.

Os resultados mostram também que, mesmo com pequenas concentrações de BTF, é possível observar suas bandas características, para melhor visualização, ver Figura 39, onde são mostrados os espectros Raman do substrato após imersão nas soluções de BTF com as menores concentrações.

Os espectros mostraram comportamentos semelhantes com relação à banda Raman do plásmon de superfície, onde pode ser observada a modificação da banda com diferentes concentrações do BTF, que provavelmente estão atribuídas às ligações Au-S e Au-Au.

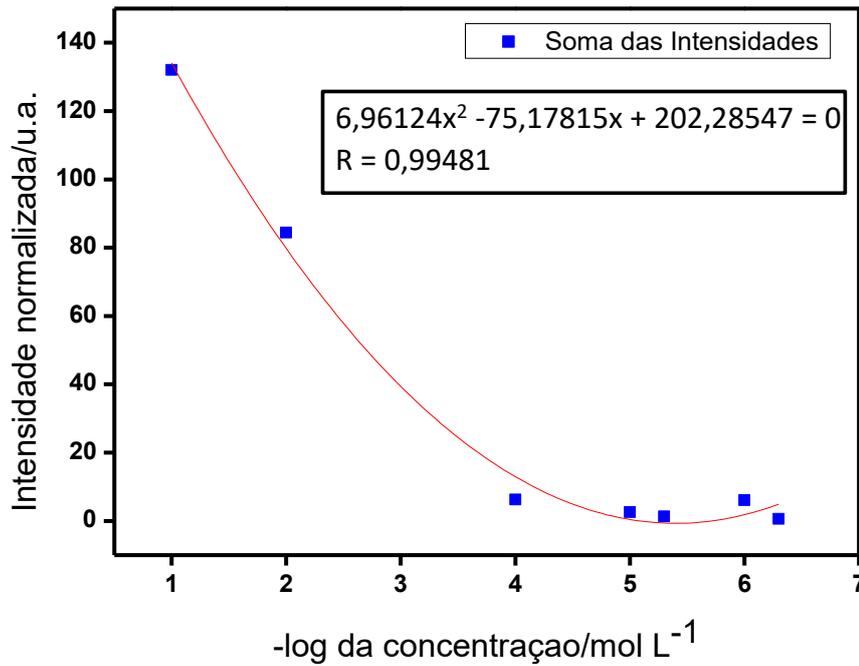
Figura 39- Espectros Raman do substrato após imersão em soluções de BTF com as menores concentrações.



Fonte: autora da tese, 2017.

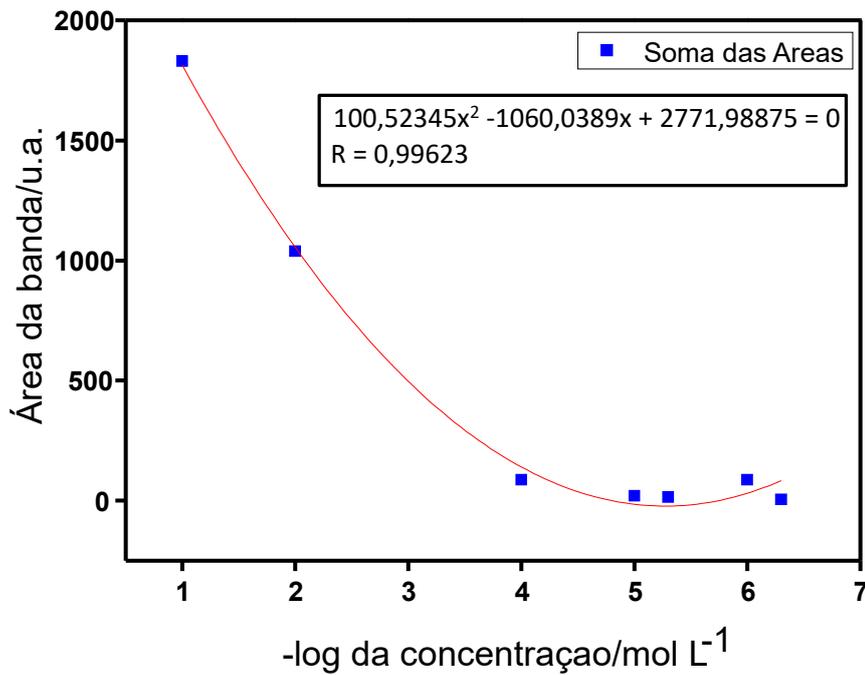
Para estudar a correlação entre a intensidade das bandas referentes ao BTF e a sua concentração, foram gerados dois gráficos, mostrados nas Figuras 42 e 43. A Figura 40 está relacionada à soma das intensidades normalizadas das bandas SERS do BTF e a Figura 41, à soma das áreas das mesmas bandas. Os dois gráficos mostraram comportamentos semelhantes, assim podemos utilizar tanto a intensidade quanto a área das bandas para confecção dos gráficos. Foram escolhidas concentrações específicas, que mostraram comportamentos mais condizente com o esperado, os mesmos exibiram uma tendência de quanto maior a concentração, maior a intensidade das bandas, assim, podendo talvez serem usados, com uma maior elaboração, como uma curva analítica para a determinação desta molécula.

Figura 40- Gráfico da intensidade normalizada referente à soma das intensidades das bandas SERS do BTF em função de $-\log$ de sua concentração.



Fonte: autora da tese, 2017.

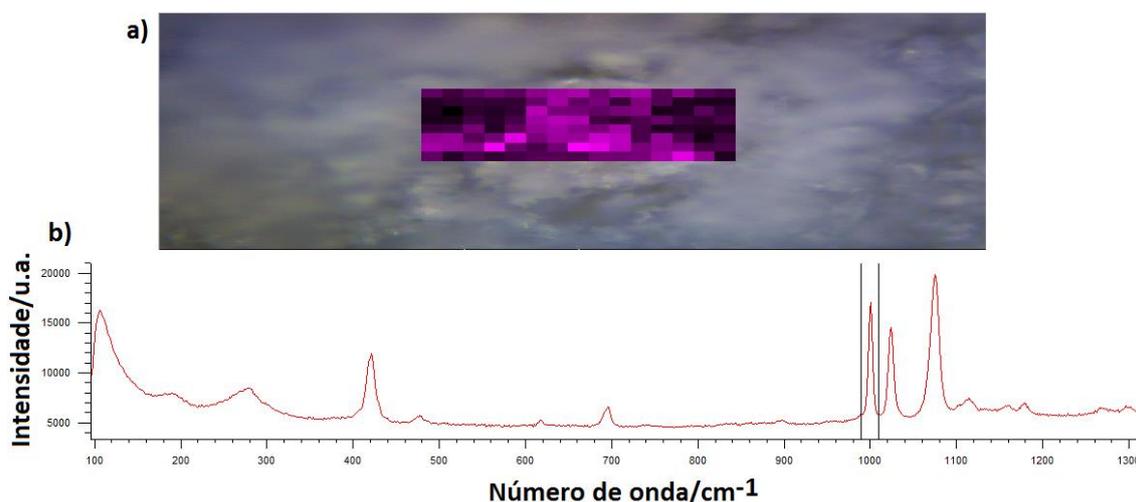
Figura 41- Gráfico da soma das áreas das bandas SERS normalizadas do BTF em função de $-\log$ de sua concentração.



Fonte: autora da tese, 2017.

A Figura 42 mostra o resultado do mapeamento do substrato após imersão em solução de BTF em concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, onde podemos observar a distribuição dos espectros com maiores e menores intensidades dentro da área escolhida, levando em consideração a intensidade da banda em $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$.

Figura 42- Análise de mapeamento de área no substrato após imersão em solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de BTF (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b).



Fonte: autora da tese, 2017.

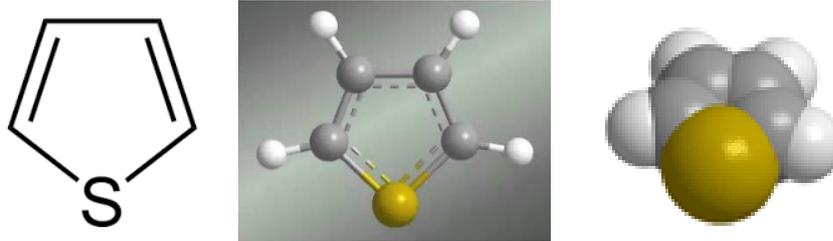
Como já mencionado, neste estudo foi escolhida a banda em $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ como referência para a geração da imagem do mapa. Na Figura, o sinal com a maior intensidade caracteriza-se pela coloração violeta mais intensa.

Estes estudos indicam que o nosso substrato exibiu uma boa atividade SERS em relação à molécula de BTF, onde conseguimos observar as bandas referentes à mesma até em uma concentração de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

4.4.2.3 Tiofeno (TF) como molécula sonda

Com o mesmo objetivo da investigação SERS que foi realizada com o BTF, realizamos análises utilizando Tiofeno (Figura 43) como molécula sonda.

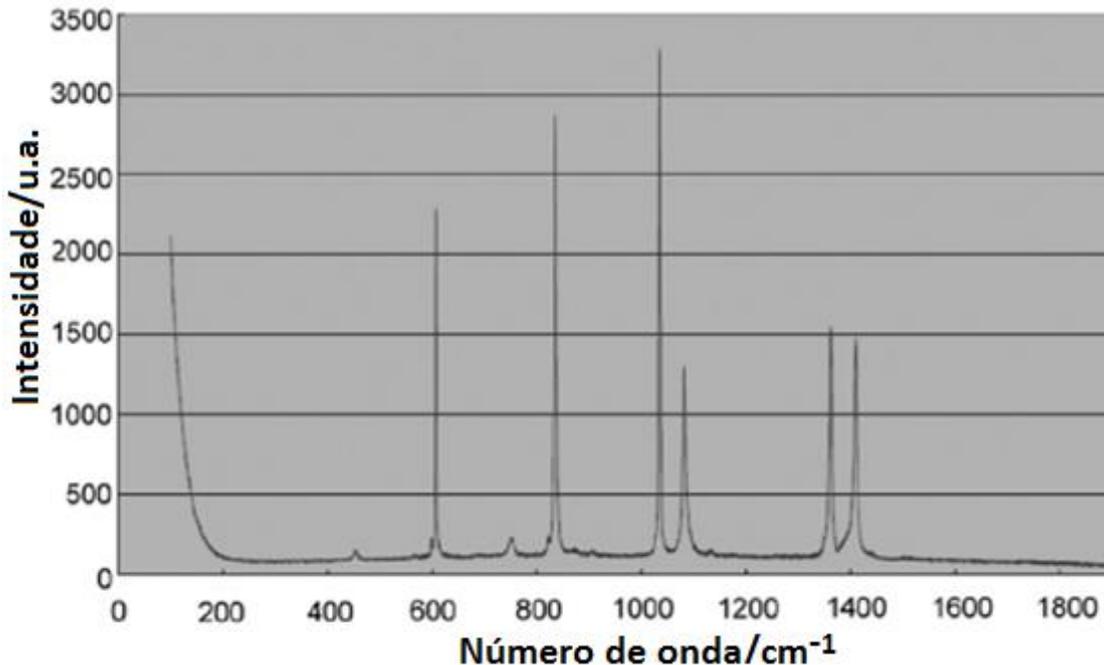
Figura 43- Estrutura molecular do Tiofeno (TF).



Fonte: Adaptação a partir de WIKIPEDIA (2016), SIGMA-ALDRICH (2016).

A Figura 44 mostra o espectro Raman do Tiofeno puro, onde podem ser observadas suas principais bandas características (HUO et al., 2015).

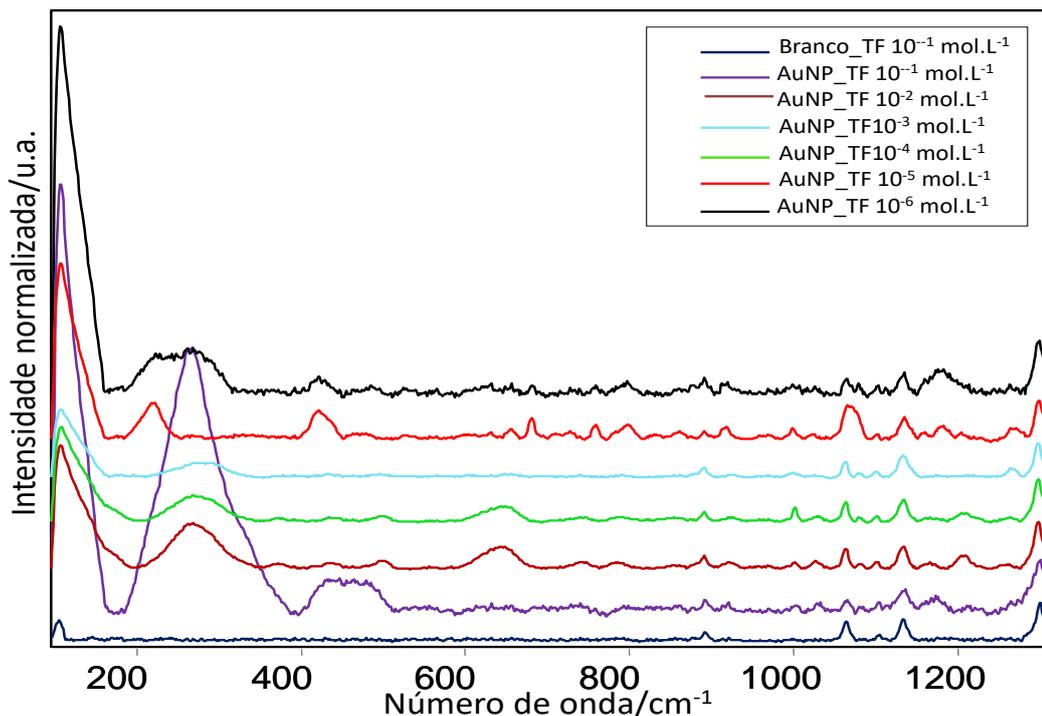
Figura 44- Espectro Raman do TF puro.



Fonte: Adaptada de HUO et al. (2015).

Assim como realizado com o BTF, foram analisados os substratos após imersão em soluções de TF com concentrações variando de 1×10^{-1} a 1×10^{-6} mol L⁻¹, o resultado está mostrado nas Figuras 45 e 46, a seguir, onde podemos observar uma intensificação nas bandas características referentes ao TF até uma concentração de 1×10^{-6} mol L⁻¹, o que não pode ser observado com o substrato sem AuNPs.

Figura 45- Espectros Raman do substrato após imersão em soluções de tiofeno com diferentes concentrações.



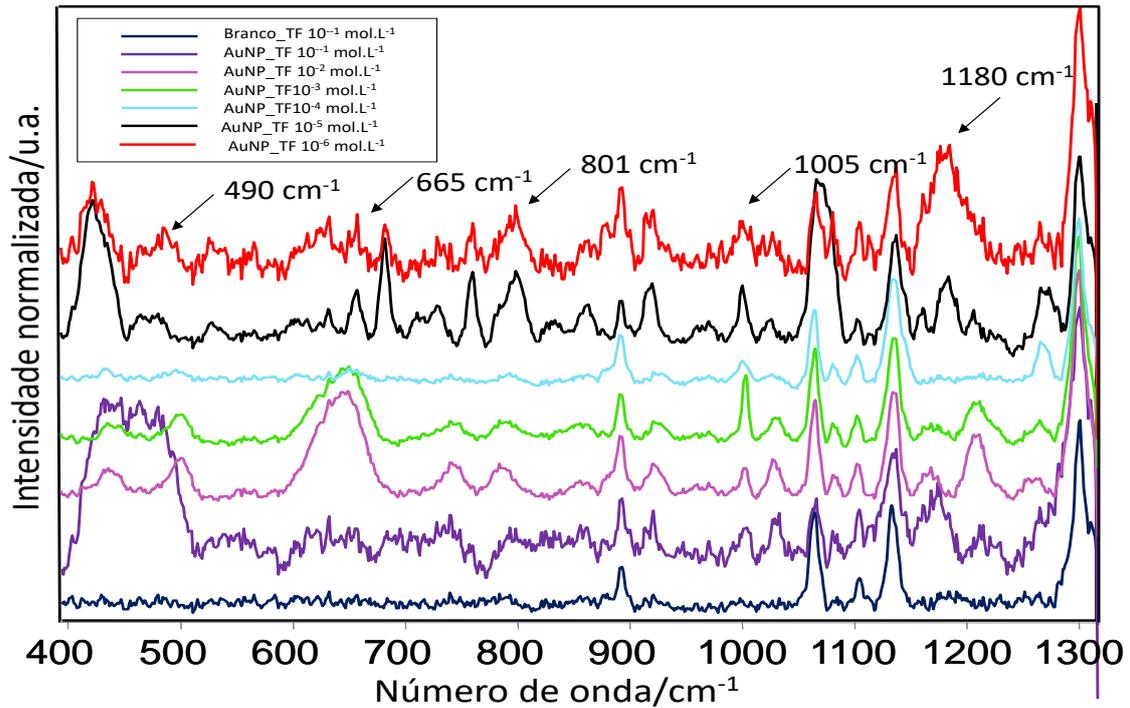
Fonte: autora da tese, 2017.

Pode-se observar também a modificação da banda referente ao plásmon de superfície, em aproximadamente 260 cm^{-1} , no substrato após a imersão na solução de TF, pelo deslocamento da banda para $\sim 210\text{ cm}^{-1}$, podendo ser atribuídas às ligações Au-Au e Au-S, indicando a interação direta da molécula com a superfície das AuNPs presentes no substrato.

A Figura 46 foi confeccionada, pois ficou um pouco mais difícil de visualizar as bandas referentes ao TF nos espectros mostrados na Figura 45, assim, foi realizado um corte nos espectros, promovendo uma amplificação na visualização das referidas bandas, como pôde ser observado.

A partir dos espectros mostrados nas Figuras 45 e 46, foi elaborada a Tabela 7, a qual mostra os números de onda das bandas vibracionais do TF nos espectros Raman e SERS, assim como suas atribuições (KUDELSKI, 2005; FRANK, 2007; BÜRGI, 2015; HUO et al., 2015; MUÑOZ-PÉREZ et al., 2016).

Figura 46- Espectros Raman do substrato após imersão em soluções de tiofeno com diferentes concentrações (CORTE).



Fonte: autora da tese, 2017.

Tabela 7- Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos espectros Raman e SERS do TF.

Raman (cm ⁻¹)	SERS (cm ⁻¹)	Atribuição-tentativa
1360	-	ν C-C + δ C-H
-	1180	δ C-H + ν C-C
1075	1079	δ C-H + ν C-S
1020	1030	δ ass do anel
-	1005	Respiração do anel
810	801	ρ C-H + ν C-S
600	665	ρ C-H
-	490	ρ C-H + δ C-S-C no plano
-	~260	ν Au-Au
-	~210	ν Au-S

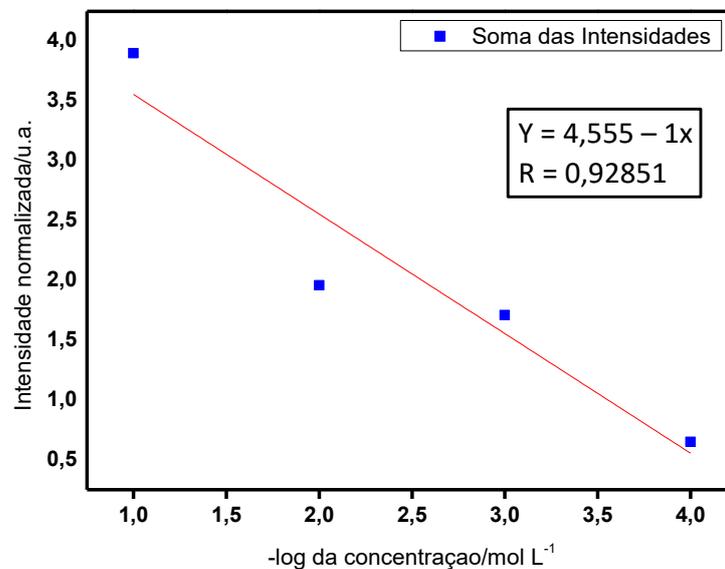
Fonte: autora da tese, 2017.

Nota: ν – estiramento, δ – deformação angular, τ – torção, γ - deformação fora do plano.

Da mesma maneira que no estudo das bandas do BTF, podemos notar o aparecimento de bandas não observadas no espectro Raman normal do TF, assim como a modificação da banda referente ao plásmon de superfície.

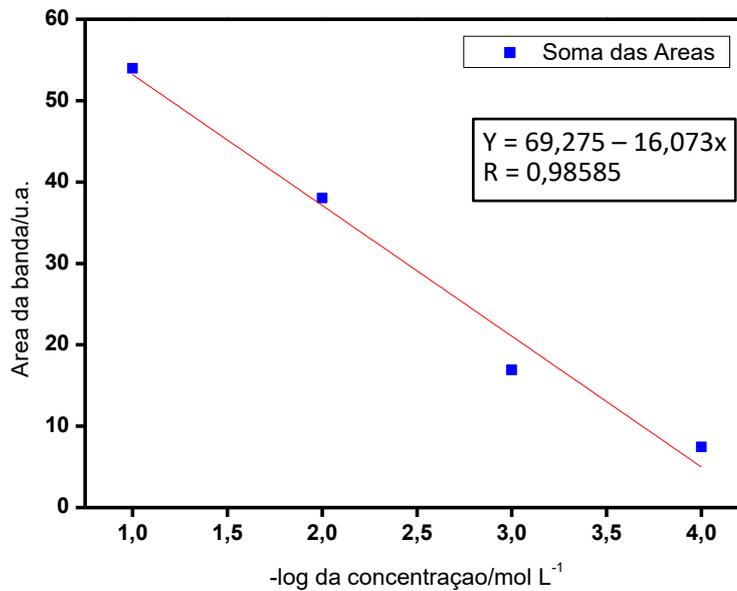
A partir dos resultados obtidos, foram construídos gráficos relacionando as somas das intensidades das bandas e das áreas das mesmas presentes nos espectros SERS do TF com as respectivas concentrações (Figuras 47 e 48), sendo escolhido agora apenas quatro concentrações, as quais mostraram uma tendência de comportamento como esperado.

Figura 47- Gráfico da intensidade normalizada referente à soma das intensidades normalizadas das bandas do tiofeno em função de $-\log$ de sua concentração.



Fonte: autora da tese, 2017.

Figura 48- Gráfico da soma das áreas das bandas normalizadas do TF em função de – log de sua concentração.

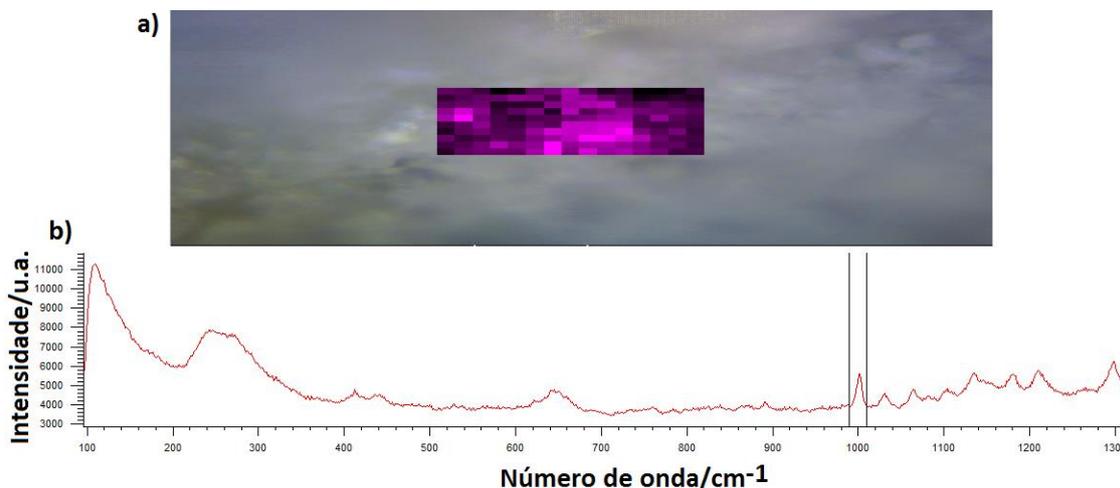


Fonte: autora da tese, 2017.

Neste caso, podemos notar que utilizando a área da banda obtivemos um comportamento mais linear do que utilizando as intensidades das bandas, que pode ser comprovado se observarmos os valores dos respectivos R obtidos através da geração dos gráficos.

Em uma área retangular da amostra após a imersão na solução de TF com concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹, podemos observar o resultado do mapeamento tomando como referência a banda em ~ 1005 cm⁻¹, mostrado na Figura 49. A área com coloração violeta mais intensa indica um espectro com uma maior intensificação desta banda referente ao TF.

Figura 49- Análise do mapeamento de área no substrato após imersão em solução 1×10^{-3} mol L⁻¹ de TF (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b).



Fonte: autora da tese, 2017.

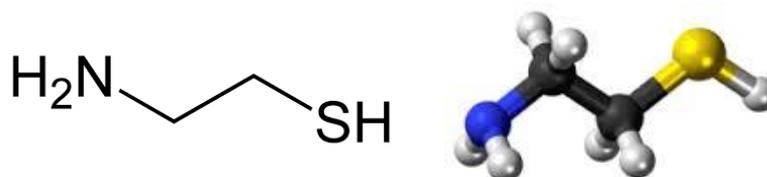
Os resultados continuam a nos mostrar a eficiência do substrato SERS-ativo obtido, uma vez que este demonstrou boas atividades SERS em relação às moléculas sonda utilizadas até o momento.

Para possíveis aplicações nas áreas biológica e medicinal, escolhemos mais duas moléculas sondas para avaliar a atividade do nosso substrato em relação às mesmas: cisteamina e cisteína, os resultados para este estudo estarão mostrados nas próximas seções.

4.4.2.4 Cisteamina como molécula sonda

Utilizando os mesmos procedimentos anteriores, porém agora utilizando apenas a concentração de 1×10^{-1} mol L⁻¹ de cisteamina (Figura 50), foi realizada uma avaliação do comportamento do substrato frente a esta nova molécula.

Figura 50- Estrutura molecular da cisteamina.

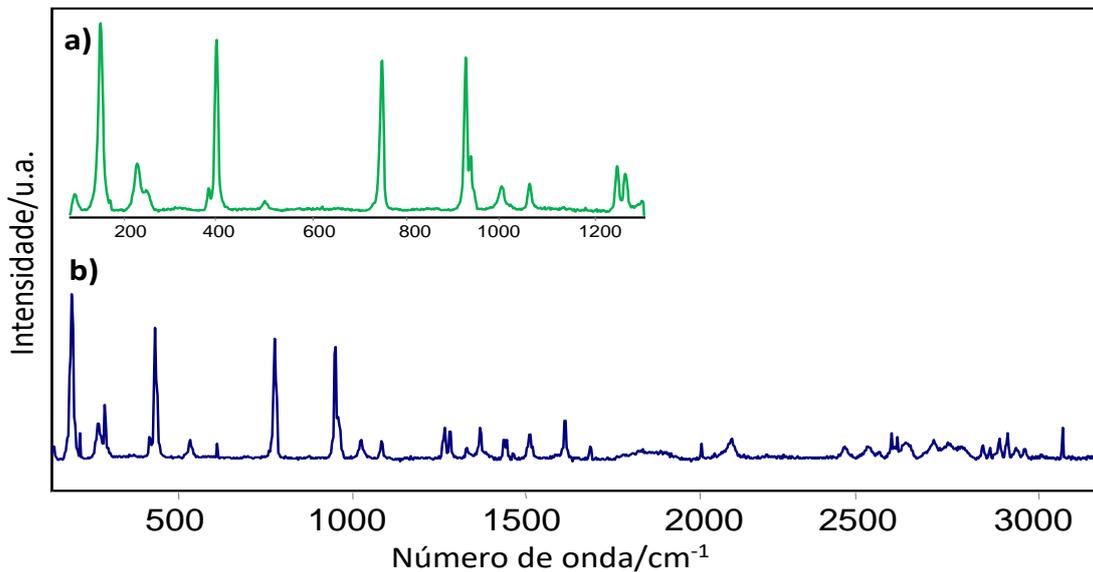


Fonte: Adaptação a partir de WIKIPEDIA (2016).

Podemos ver na Figura 51, o espectro da cisteamina pura, onde observamos suas bandas Raman características.

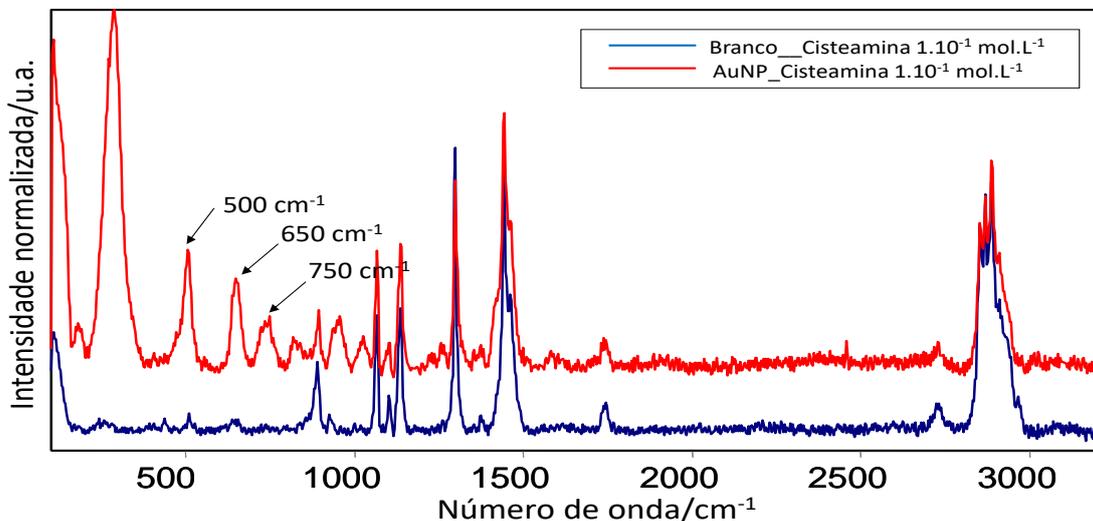
Foi obtido também o espectro Raman da cisteamina após a imersão do substrato em solução com concentração de $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de cisteamina, como pode ser observado na Figura 52.

Figura 51- Espectro Raman da cisteamina pura, onde (a) região de maior interesse nesse estudo e (b) espectro completo.



Fonte: autora da tese, 2017.

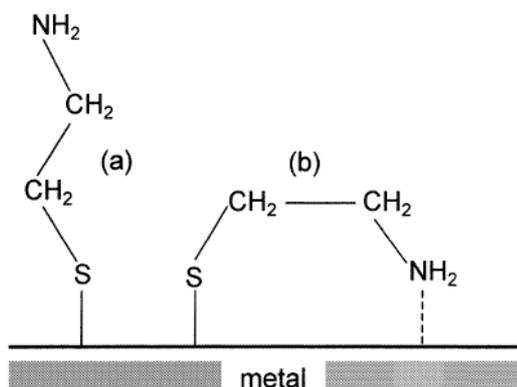
Figura 52- Espectros Raman obtidos dos substratos com e sem AuNPs após imersão em solução de cisteamina com concentração de $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: autora da tese, 2017.

Após imersão do substrato em solução de cisteamina de concentração 1×10^{-1} mol L⁻¹ pode-se observar, Figura 52, que houve, além da intensificação de algumas bandas, o aparecimento de três novas bandas em aproximadamente 500, 650 e 750 cm⁻¹, que podem ser atribuídas ao estiramento de ligação S-S (formação de ligação dissulfeto) (KUDELSKI (1999), e a dois tipos de ligações –S-C(-C) das moléculas da cisteamina após a adsorção na superfície metálica, maneiras de adsorção gauche e trans, respectivamente (MICHOTA, 2002), como mostrado na Figura 53.

Figura 53- Estruturas possíveis das moléculas de cisteamina adsorvidas na superfície metálica: (a) conformação trans, (b) conformação gauche. Os termos trans e gauche descrevem a conformação do carbono próximo ao átomo de enxofre.



Fonte: MICHOTA (2002).

Através dos espectros mostrados nas Figuras 51 e 52 e considerando as possíveis estruturas mostradas na Figura 53, podemos fazer atribuições-tentativas às principais bandas Raman e SERS da cisteamina. A Tabela 8 mostra os números de onda das principais bandas vibracionais da cisteamina apresentadas nos espectros anteriores, bem como suas atribuições sugeridas (KUDELSKI, 1999; RIAUBA et al., 2006; FLEMING et al., 2009; BÜRGI, 2015).

Tabela 8- Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos espectros Raman e SERS da cisteamina, baseado de acordo com.

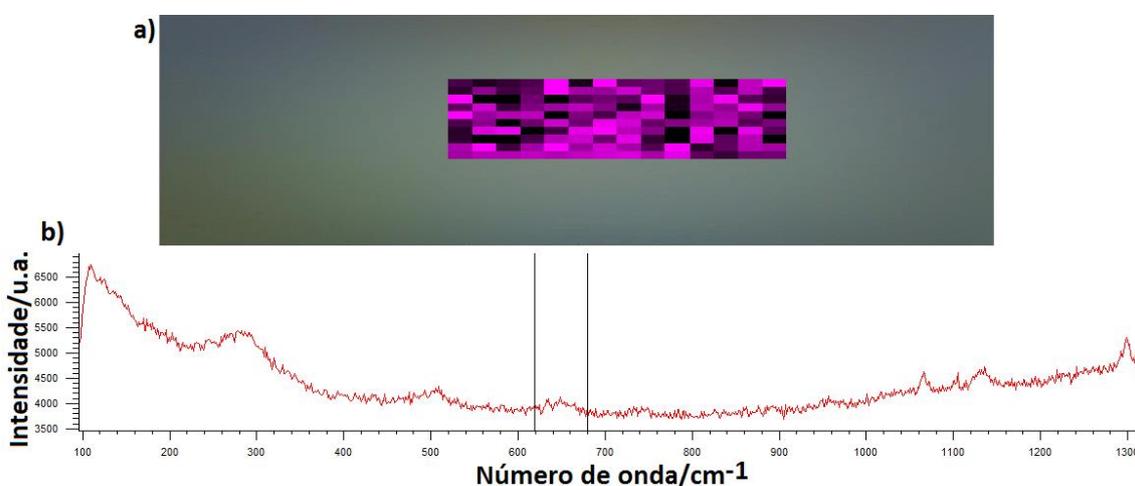
Raman (cm^{-1})	SERS (cm^{-1})	Atribuição
161	-	τ (N-)C-C(-S)
250	-	ν Au-Au
-	287	ν Au-S
409	-	δ C-C(-N)
-	508	ν S-S
-	652	ν C-S (Gauche)
-	747	ν C-S (Trans)
761	-	ν C-S
939	894	ν C-C(-N)
1016	-	ν C-C(-N)
1075	1067	ν C-N

Fonte: autora da tese, 2017.

Nota: ν – estiramento, δ – deformação angular, τ – torção, γ - deformação fora do plano.

Podemos observar o mapeamento do substrato após imersão em solução de cisteamina com concentração $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ na Figura 54, onde a área violeta mais intensa mostra o local onde houve maior intensificação SERS da banda em $\sim 650 \text{ cm}^{-1}$.

Figura 54- Análise do mapeamento de área no substrato após imersão em solução $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de cisteamina (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b).

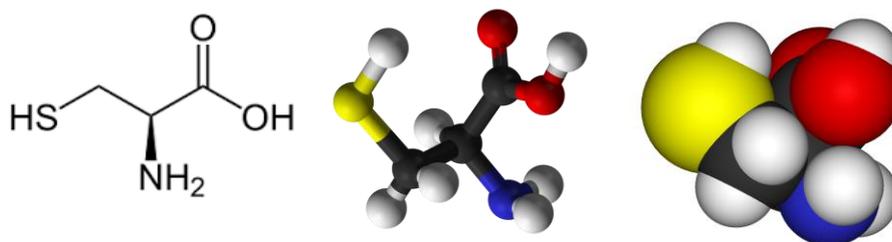


Fonte: autora da tese, 2017.

4.4.2.5 Cisteína como molécula sonda

Agora, com a molécula sonda cisteína (Figura 55), seguindo procedimentos semelhantes aos aplicados à cisteamina, mas com concentração de $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, também foi realizada uma avaliação do comportamento do substrato frente esta nova molécula de interesse.

Figura 55- Estrutura molecular da cisteína.

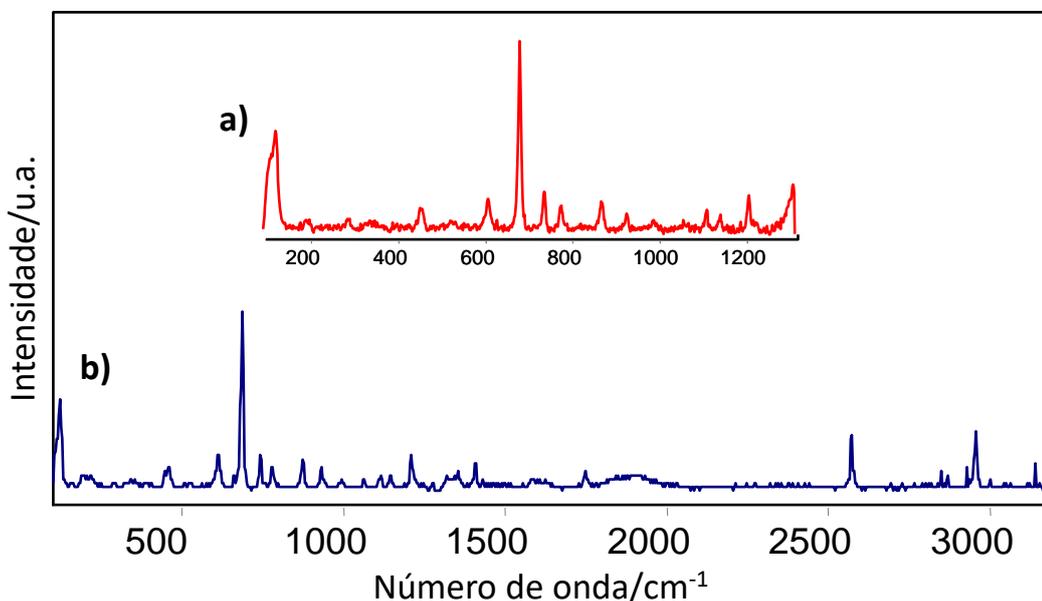


Fonte: Adaptação a partir de WIKIPEDIA (2016)

O espectro da cisteína puro pode ser observado na Figura 56, onde observamos suas bandas vibracionais Raman principais.

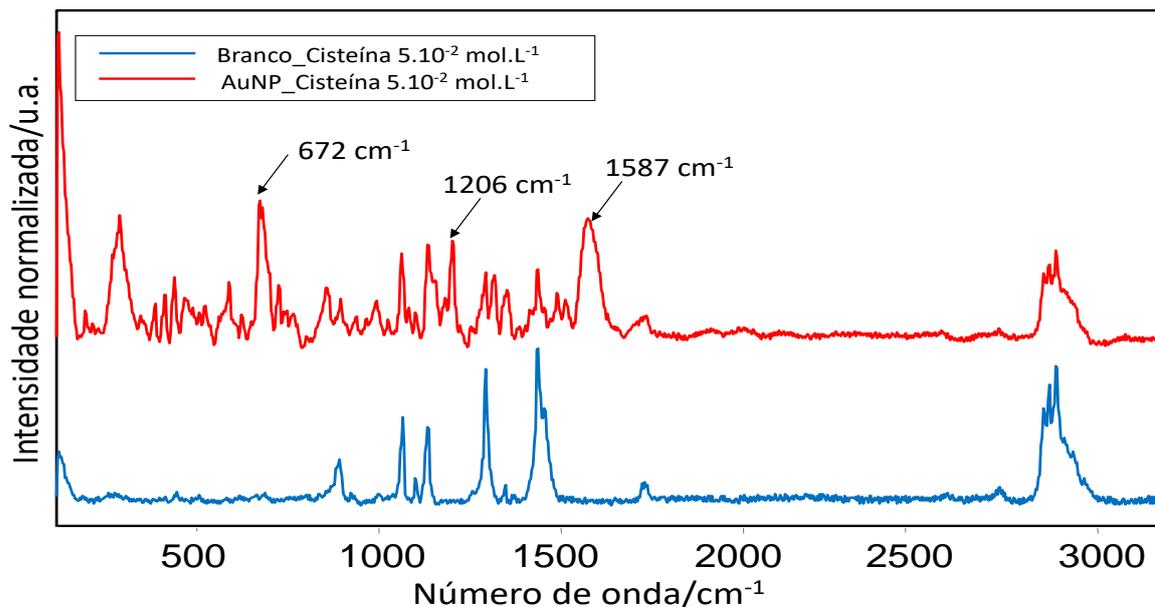
Após imersão do substrato em solução de cisteína de concentração $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pode-se observar, através da Figura 57, que houve intensificação de algumas bandas referentes à cisteína, assim como o aparecimento de novas bandas.

Figura 56- Espectro Raman da cisteína pura, onde (a) região de maior interesse no nosso estudo e (b) espectro completo.



Fonte: autora da tese, 2017.

Figura 57- Espectros Raman obtidos dos substratos com e sem AuNPs após imersão em solução de cisteína com concentração de $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: autora da tese, 2017.

Através dos espectros mostrados nas Figuras 56 e 57, foram feitas as atribuições sugeridas para as principais bandas Raman e SERS da cisteína. A Tabela 9 mostra os números de onda das principais bandas vibracionais da cisteína apresentadas nos espectros anteriores (FLEMING et al., 2009; ZHU et al., 2011; SMITH, 2013; NDOKOYE et al., 2014; BÜRGI, 2015; SONG et al., 2015).

Tabela 9- Atribuição sugerida para as bandas vibracionais dos espectros Raman e SERS da cisteína.

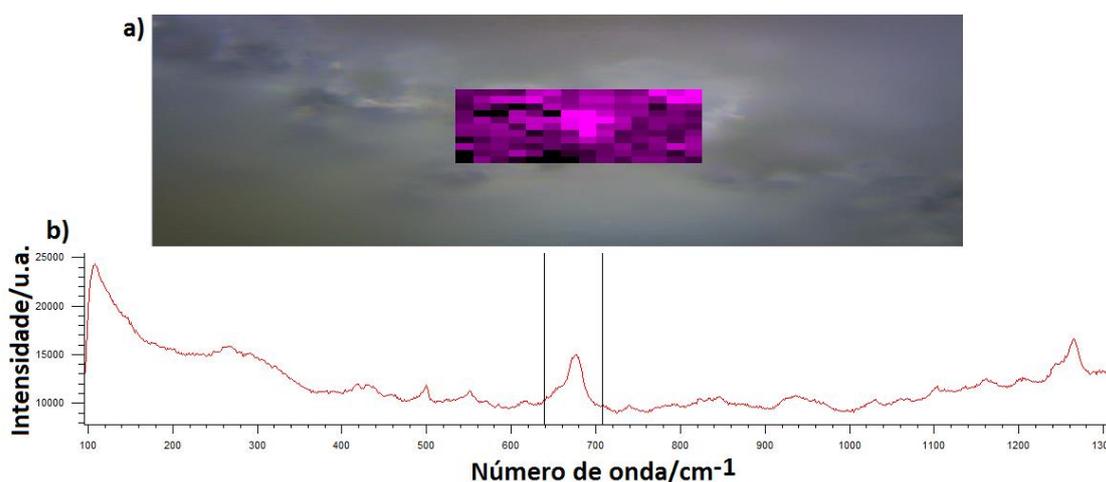
Raman (cm^{-1})	SERS (cm^{-1})	Atribuição-tentativa
195	-	τ (N)-C-C(-S)
-	278	ν Au-S + ν Au-N
459	-	NH ₃ Rocking
613	-	ν C-S
685	672	ν C-S
743	723	ν C-C-C sim
781	-	γ O-C-O ⁻
874	858	ν C-C
932	939	δ C-C(-N)
1212	1206	ν C-H(CH ₂)
-	1587	ν N-H + δ N-H + ν_s C=O + ν_{as} C=O

Fonte: autora da tese, 2017.

Nota: ν – estiramento, δ – deformação angular, τ – torção, γ - deformação fora do plano.

Podemos observar o mapeamento feito em uma área do substrato após imersão em solução de cisteína a $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 58), onde as áreas com violeta mais intenso correspondem às áreas onde o substrato promoveu maiores intensificações para a banda em $\sim 715 \text{ cm}^{-1}$.

Figura 58- Análise do mapeamento de área no substrato após imersão em solução $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de cisteína (a) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (b).



Fonte: autora da tese, 2017.

4.4.5 Fator de Intensificação SERS (EF)

Para qualificar nosso material como um bom substrato SERS-ativo, a partir dos resultados obtidos, foi calculado o Fator de Intensificação SERS (EF) do mesmo em relação a cada uma das moléculas sonda utilizadas.

Os cálculos foram realizados a partir de aproximações utilizando a equação descrita na seção 2.3.4:

$$EF = \frac{I_{SERS}/N_{ads}}{I_{bulk}/N_{bulk}}$$

Os valores de I_{SERS} e I_{bulk} para cada molécula foram obtidos experimentalmente após a obtenção dos espectros médios, utilizando uma das bandas de cada molécula. Para molécula do 4-ATP foi utilizada a intensidade da banda em $\sim 1008 \text{ cm}^{-1}$, já para a o BTf foi utilizada a banda em $\sim 1018 \text{ cm}^{-1}$, para a cisteamina a banda em $\sim 508 \text{ cm}^{-1}$, para a cisteína a banda em $\sim 687 \text{ cm}^{-1}$, e para o TF não foi

possível a obtenção do EF, uma vez que não obtivemos o espectro Raman do mesmo puro.

A determinação dos valores aproximados de N_{ads} e N_{bulk} foram obtidos a partir das densidades de cada molécula e considerando que as mesmas foram distribuídas uniformemente pela superfície do substrato, assim, foi possível a obtenção do número de moléculas por determinada área da substância pura e número de moléculas distribuídas pela mesma área no substrato sólido.

Aplicando os valores encontrados na fórmula descrita anteriormente, foram obtidos os valores aproximados de EFs das moléculas sondas utilizadas neste trabalho, e os resultados estão expostos na Tabela 10.

Tabela 10- Fatores de Intensificação calculados para as moléculas sonda utilizadas.

Molécula sonda	Banda de referência	Concentração	Fator de Intensificação
4-Aminotiofenol	~1008 cm ⁻¹	1x10 ⁻³ mol L ⁻¹	737,74
Benzotiofeno	~1018 cm ⁻¹	1x10 ⁻³ mol L ⁻¹	2777,10
Tiofeno	-	-	-
Cisteamina	~508 cm ⁻¹	1x10 ⁻¹ mol L ⁻¹	199,06
Cisteína	~687 cm ⁻¹	5x10 ⁻² mol L ⁻¹	177,98

Fonte: autora da tese, 2017.

Como não foi possível a obtenção do espectro do TF puro, o EF do substrato em relação a esta molécula não pôde ser calculado.

A partir dos valores dos EFs mostrados na Tabela 10, podemos perceber que o substrato SERS ativo utilizado neste trabalho teve uma melhor eficiência na intensificação das bandas Raman do BTF, quando comparado com os EFs das outras moléculas sonda utilizadas.

A diferença entre os EFs encontrados com as moléculas sonda utilizadas pode estar associada a diversos fatores, tais como: modos de interação química entre as moléculas e a superfície do substrato, polarizabilidade das ligações em cada molécula, maneira de incidência do laser, entre outros, os quais não fazem parte do escopo da nossa discussão.

É importante ressaltar também que foram utilizados cálculos aproximados para a obtenção dos EFs e, lembrando, que o substrato obtido mostrou-se não possuir distribuição homogênea das nanopartículas por todo o material, assim podendo está influenciando nos valores dos EFs obtidos. Por isso, para cálculos mais exatos, são necessárias otimizações do sistema e das estratégias utilizadas não só para os cálculos, como também para as análises realizadas a fim de se obter valores de EFs de ordens maiores para todas as moléculas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Obtivemos nanopartículas de ouro dispersas em óleo de mamona de forma fácil, sendo possível a imobilização das mesmas após a mistura com óleo de mamona hidrogenado, formando um substrato sólido.

As técnicas de caracterização utilizadas nos permitiram observar a formação de nanopartículas de ouro em formato anisotrópico, semelhante a estrelas, em tamanhos médios de ~100 nm. A técnica de absorção na região do UV-vis nos mostrou também que não houve grande alteração das AuNPs após imobilização das mesmas em óleo de mamona hidrogenado.

Foram produzidos substratos altamente estáveis, uma vez que todos os substratos utilizados foram originados de uma mesma síntese, e uma parte deles foi utilizada alguns meses após sua preparação e demonstrou atividade semelhante. Assim como sua estabilidade no poder de intensificação pôde ser observada analisando o mesmo substrato após duas semanas e mantendo-se o sinal da molécula de 4-ATP constante

Os substratos obtidos apresentaram irregularidade na formação de “hot-spots”, uma vez que durante sua preparação não seria possível o controle na dispersão das nanopartículas no meio de imobilização, porém para superar esta limitação, foram utilizados espectros médios obtidos a partir de um mapeamento do substrato com aproximadamente 150 espectros registrados.

O substrato mostrou versatilidade, uma vez que foi possível a observação da intensificação de bandas Raman com diferentes moléculas sonda utilizadas (benzotiofeno, tiofeno, 4-aminotiofeno, cisteamina, cisteína), onde foram observadas suas respectivas bandas SERS em baixas concentrações. O que nos leva a acreditar que o mesmo tem potencial para ser aplicado em diversas áreas da química, tais como: combustíveis, catálise, bioquímica, medicina, entre outras.

Por fim, de acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o substrato desenvolvido, a partir de nanopartículas de ouro em uma matriz orgânica, poderá ser utilizado para análises de investigação qualitativas e até quantitativas, uma vez que o mesmo mostrou uma tendência de correlação linear entre intensidade das bandas das moléculas sonda e concentração das mesmas, por Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície, obtendo-se EFs da ordem de 10^2 a 10^3 com as diferentes moléculas sonda utilizadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 4-AMINOTHIOPHENOL, 97%. **VWR**. Disponível em: <http://www.ca.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=CAAAA14082-06>. Acesso em: 18 ago. 2016.
- 4-AMINOTHIOPHENOL. **PubChem – Open Chemistry Database**. Disponível em: <<http://www.pubchem.ncbi.nlm.gov/compound/4-Aminothiophenol#section=3D-Conformer>>. Acesso em: 18 ago. 2016.
- ABDALIA, S.; BLANCH, E. W. Surface enhanced Raman optical activity (SEROA). **Chem. Soc. Rev.**, v. 37, p. 980-992, 2008.
- ACEVEDO, Z. C. S. **Detección de compuestos xenobióticos mediante transistores de efecto campo basados en nanotubos de carbono**. 2009. 213 p. Tese (Doutorado em Química Analítica)- Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2009.
- ANDRADA, D. M. et al. **Nanotubos de Carbono como Substratos SERS?** In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 34, 2011. Florianópolis. Anais... Santa Catarina: 2011.
- ANJOS, A. **Os vitrais medievais**. Obvious. Disponível em: <[HTTP://lounge.obviousmag.org/anna_anjos/2013/07/os-vitrais-medievais/](http://lounge.obviousmag.org/anna_anjos/2013/07/os-vitrais-medievais/)>. Acesso em: 15 ago. 2016.
- ARIAS, J. M. et al. FTIR and Raman analysis of L-cysteine ethyl ester HCl interaction with dipalmitoylphosphatidylcholine in anhydrous and hydrated states. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, p. 369-376, 2015.
- BAGNATO, V. S. Os fundamentos da luz *laser*. **Física na Escola**, v. 2, n. 2, 2001.
- BAKER, G. A.; MOORE, D. S. Progress in plasmonic engineering of surface-enhanced Raman-scattering substrates toward ultra-trace analysis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 382, p. 1751-1770, 2005.
- BAMRUNGSAP, S. et al. SERS-fluorescence dual mode nanotags for cervical cancer detection using aptamers conjugated to gold-silver nanorods. **Microchim Acta**, v. 183, p. 249-256, 2016.
- BANHOLZER, M. J. et al. Rationally designed nanostructures for surface-enhanced Raman spectroscopy. **Chem. Soc. Rev.**, v. 37, p. 885-897, 2008.

BARBOSA, P. C. C. **Aplicação de fluorescência induzida por laser em monitoramento ambiental**. 2003. 139 p. Tese (Doutorado em Física)- Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

BEATTIE, J. R.; BELL, S. E. J.; MOSS, B. W. A Critical evaluation of Raman spectroscopy for the analysis of lipids: fatty acid methyl esters. **Lipids**, v. 39, n. 5, p. 407-419, 2004.

BENZOTHIOPHENE. **Wikimedia Commons**. Disponível em: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benzothiophene-3D-balls.png>> Acesso em: 18 ago. 2016.

BENZOTHIOPHENE. **Wikimedia Commons**. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benzothiophene_structure.png>. Acesso em: 18 ago. 2016.

BENZOTHIOPHENE. **Wikipedia**. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Benzothiophene#/media/File:Benzothiophene3d.png>> Acesso em: 18 ago. 2016.

BRASIL. Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis nº 40, de 25 de outubro de 2013.

BRASIL. Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis nº 03, de 27 de janeiro de 2016.

BRAUN, G. et al. Chemically patterned microspheres for controlled nanoparticle assembly in the construction of SERS hot spots. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 7760-7761, 2007.

BRUST, M. et al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p. 801-802, 1994.

BRUST, M. et al. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p. 1655-1656, 1995.

BÜRGI, T. Properties of the gold-sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters. **Nanoscale**, v. 7, p. 15553-15567, 2015.

CAI, Q. et al. Catalytic degradation of dye molecules and *in situ* SERS monitoring by peroxidase-like Au/CuS composite. **Nanoscale**, v. 6, p. 8117-8123, 2014.

CANPEAN, V.; ASTILEAN, S. Temperature effect on the SERS signature of *p*-aminothiophenol: A new evidence for the production of *p,p'*-dimercaptoazobenzene on metallic nanostructures. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 16, p. 862-867, 2012.

CAO, B.; LIU, B.; YANG, J. Facile synthesis of single crystalline gold nanoplates and SERS investigations of 4-aminothiophenol. **CrysEngComm**, v. 15, p. 5735-5738, 2013.

CARVALHO, J. E. **Nanomundo – Um universo de descobertas e possibilidade**. São Paulo: SENAI-SP Editora, 2012.

CHAUHAN, D. S.; ROHIT, S. **Synthesis and characterization of gold encapsulated and tamoxifen loaded PLGA nanoparticles for breast cancer theranostics**. In International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering, 9., 2015, Hawaii. "Anais...", USA, 2015.

CHEN, G. et al. Direct application of gold nanoparticles to one-pot electrochemical biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 849, p. 1-6, 2014.

COSTA, P. M. N. **Diagnóstico molecular da tuberculose bovina**. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina)- Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2009.

CYSTEAMINE. **Wikipedia**. Disponível em:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteamine#/media>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

CYSTEINE. **Wikipedia**. Disponível em:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine#/media>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

DA SILVA, A. C. C. **Nanotecnologia em diagnóstico e terapia no Brasil**. 2015. 128 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2015.

DA SILVA, E. C. **Síntese e propriedades ópticas de sistemas coloidais contendo nanopartículas de ouro dispersas em óleo de mamona**. 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

DA SILVA, L. C. B. **Nanopartículas de ouro: aplicações no diagnóstico e tratamento do câncer**. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina)- Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2015.

DA SILVA, M. G. A.; **Síntese, dinâmica de formação, caracterização e propriedades ópticas de nanobastões de ouro dispersos em meio aquoso e matrizes orgânicas.** 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e Naturais)- Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

DA SILVA, S. I. P.; NERY, M. P.; TÉLLEZ S., C. A. Castor oil catalytic hydrogenation reaction monitored by Raman spectroscopy. **Material Letters**, v. 45, p. 197-202, 2000.

DE BARROS, A. **Filmes de nanocompósitos de polímero condutor, nanopartículas de argila e nanopartículas de ouro para aplicação em sensores ambientais.** 181 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais)- Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Sorocaba, 2015.

DE SOUZA, M. I. A. **Incorporação de nanopartículas de óxido de zinco a um cimento de ionômero de vidro por meio da calcinação: Avaliação de propriedades mecânicas e físicas.** 2016. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas)- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2016.

DEVI, P. R. Synthesis and characterization of Arabic gum capped gold nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **Materials Letters**, v. 139, p. 241-244, 2015.

DOS SANTOS, N. T. **Nanopartículas de ouro como sistema de liberação de droga associada a Berberina: síntese e caracterização.** 40 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia)- Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

DRUMMOND, A. L. **Compósitos poliméricos obtidos a partir do óleo de baru – Síntese e caracterização.** 2008. 160 p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

EDELSTEIN, A. S.; CAMMARATA, R.C. **Nanomaterials - Synthesis, Properties and Applications.** Bristol: Institute of Physics Publishing, 1998.

ELBIALY, N. S.; FATHY, M. M.; KHALIL, W. M. Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, p. 190-199, 2015.

ESPECTROSCOPIA Raman – Princípios & Aplicações. UFSC: 2006. Disponível em: <http://www.qmc.ufsc.br/~lab313/qmc_5131/>. Acesso em: 13 mar. 2012.

EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de Análise Química.** v. 1, São Paulo: Edgard Blücher, 1972.

FAN, M.; ANDRADE, G. F. S.; BROLO, A. G. A review on the fabrication of substrates for Surface Enhanced Raman Spectroscopy and their applications in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 693, p. 7-25, 2011.

FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A.; SALA, O. Vinte anos do efeito SERS. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 541-552, 1999.

FATOBENE, T. J. **Espectroscopia Raman**. Perkin Elmer do Brasil. São Paulo, 2008.

FERNANDES, C. R. **Espalhamento Raman dependente da temperatura em Cristais de ácido DL-aspártico**. 2010. 101 p. Dissertação (Mestrado em Física)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman Spectroscopy**. 2. ed. Elsevier, 2003. ISBN: 978-0-12-254105-6.

FERREIRA, A. L. **Propriedades vibracionais de polissacarídeos naturais**. 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado em Física)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FERREIRA, M. L. R. **Espectroscopia Raman em cristais de KDP e Nanotubos de carbono** (implantação da técnica). 2008. 52 p. Dissertação (Mestrado em Física)- Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

FIRKALA, T. et al. Specific behavior of the *p*-aminothiophenol – Silver sol system in their Ultra-Violet_Visible (UV-visible) and Surface Enhanced Raman (SERS). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 410, p. 59-66, 2013.

FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163-166, 1974.

FLEMING, G. D. et al. Experimental and theoretical Raman and surface-enhanced Raman scattering study of cysteine. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 40, p. 632-638, 2009.

FRANK, O.; JEHLIČKA, J.; EDWARDS, H. G. M. Raman spectroscopy as tool for the characterization of thio-polyaromatic hydrocarbons in organic minerals. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 68, p. 1065-1069, 2007.

GÓMEZ, M.; LAZZARI, M. Reliable and cheap SERS active substrates - Ordered vs disordered. **Materials Today**, v. 17, n. 7, p. 358-359, 2014.

GONG, F. et al. High-sensitivity floating-gate phototransistors based on WS₂ and MoS₂. **Adv. Funct. Mater.**, v. 26, p. 6084-6090, 2016.

GUI, M. M.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, p. 1646–1653, 2008.

HAISS, W. et al. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 4215-4221, 2007.

HAO, F. et al. Plasmon resonances of a gold nanostar. **Nano Letters**, v. 7, n. 3, p. 729-732, 2007.

HICKS, C. J., **SERS – Surface Enhanced Raman Spectroscopy**. Michigan State University, 2001.

HOANG, M. H. et al. Synthesis of gold nanoparticles capped with quaterthiophene for transistor and resistor memory devices. **Journal of Chemistry**, v. 2016, 8 p., 2015.

HUANG, Y. et al. Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy of pyridine on smooth silver electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 10652-10657, 2011.

HUH, Y. S.; ERICKSON, D. Aptamer based surface enhanced Raman scattering detection of vasopressin using multilayer nanotube arrays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1240-1243, 2010.

HUO, Z. et al. An in situ Raman spectroscopic study of benzothiophene and its desulfurization under alkaline hydrothermal conditions. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 54, p. 1397-1406, 2015.

JACINTHO, G. V. M. et al. Structural investigation of MFe₂O₄ (M = Fe, Co) magnetic fluids. **J. Phys. Chem. C**, v. 113, p. 7684-7691, 2009.

JACINTHO, G. V. M. **Síntese e caracterização de ferritas do tipo MFe₂O₄ (M = Fe ou Co) modificadas pela adsorção de ácidos graxos derivados de óleos vegetais**. 2007. 115 p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

JESURAJ, P. J.; JEGANATHAN, K. Improved hole injection in organic light emitting devices by gold nanoparticles. **RSC Adv.**, v. 5, p. 684-689, 2015.

JIANG, R. et al. Photoinduced surface catalytic coupling reactions of aminothiophenol derivatives investigated by SERS and DFT. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, p. 16427-16436, 2016.

KANO, H. et al. Linear and nonlinear Raman Microspectroscopy: history, instrumentation, and applications. **Optical Review**, v. 21, n. 6, p. 752-761, 2014.

KHOURY, C. G.; VO-DINH, T. Gold nanostars for Surface-Enhanced Raman Scattering: synthesis, characterization and optimization. **J. Phys. Chem. C**, v. 112, p. 18849-18859, 2008.

KOGELNIK, H.; PORTO, S. P. S. Continuous Helium-Neon Red Laser as a Raman source. **Journal of the Optical Society of America**, v. 53, n. 12, p. 1446-1447, 1963.

KUDELSKI, A.; HILL, W. Raman study on the structure of cysteamine monolayers on silver. **Langmuir**, v. 15, n. 9, p. 3162-3168, 1999.

KUDELSKI, A. Characterization of thiolate-based mono- and bilayers by vibrational spectroscopy: A review. **Vibrational Spectroscopy**, v. 39, p. 200–213, 2005.

LABORATÓRIO de Espectroscopia Molecular Hans Stammreich – LEM. Disponível em: <<http://lem.iq.usp.br/o-laboratorio/>>. Acesso em: 14 ago. 2016.

LANG, N. J.; LIU, B.; LIU, J. Characterization of glucose oxidation by gold nanoparticles using nanoceria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 428, p. 78-83, 2014.

LANGER, J.; NOVIKOV, S. M.; LIZ-MARZÁN, L. M. Sensing using plasmonic nanostructures and nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 26, 29 p., 2015.

LI, D. et al. Recent progress in surface enhanced Raman spectroscopy for the detection of environmental pollutants. **Microchim Acta**, v. 181, p. 23-43, 2014.

LI, N.; ZHAO, P.; ASTRUC, D. Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity. **Angewandte Chemie Int. Ed.**, v. 53, p. 1756-1789, 2014.

LIANG, R. et al. Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics. **Chem. Commun.**; v. 50, p. 14071-14081, 2014.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. **Int. Reviews in Physical Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 409-453, 2000.

LOBO, A. O. et al. Caracterização de materiais carbonosos por espectroscopia Raman. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 24, n. 2, p. 98-103, 2005.

LONGO, E. **Nanotecnologia**. In: Reunião Anual da Sociedade para o Progresso da Ciência, 56., 2004, Cuiabá. Anais... Mato Grosso: 2004.

LU, X. et al. Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles. **Annu. Rev. Phys. Chem**, v. 60, p. 167-192, 2009.

MAIMAN, T. H. et al. Stimulated optical emission in fluorescent solids. II. Spectroscopy and stimulated emission in Ruby. **Physical Review**, v. 123, n. 4, p. 1151-1157, 1961.

MARTINS, E. **O que é LASER?** Tecmundo. 2008. Disponível em: <<http://www.tecmundo.com.br/video-game/1062-o-que-e-laser-.htm>>. Acesso em: 11 out. 2016.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434-1446, 2012.

MAYER, K. M. et al. Catalytic kinetics of single gold nanoparticles observed via optical microwell arrays. **Nanotechnology**, v. 26, 6 p., 2015.

McCREERY, R. L. **Chemical Analysis: Raman Spectroscopy for Chemical Analysis**. v. 157, Wiley, 2000.

MICHOTA, A.; KUDELSKI, A.; BUKOWSKA, J. Molecular structure of cysteamine monolayers on silver and gold substrates - Comparative studies by surface-enhanced Raman scattering. **Surface Science**, v. 502-503, p. 214-218, 2002.

MILLEN, R. P.; FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A. Modelos para dispersão Raman em polímeros conjugados. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 289-295, 2005.

MORAIS, S. F. A. et al. Síntese e estabilização de nanopartículas de ouro em óleo de mamona. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 95-105, 2013.

MUÑOZ-PÉREZ, J. et al. Raman and surface enhanced Raman scattering study of the orientation of cruciform 9,10-anthracene thiophene and furan derivatives deposited on a gold colloidal surface. **Journal of Molecular Structure**, v. 1122, p. 198-204, 2016.

MUTLU, H.; MEIER, M. A. R. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v.112, p. 10–30, 2010.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganics and Coordination Compounds** Part A. 6 ed. Wiley, 2009. ISBN: 978-0-47-119406-4.

NDOKOYE, P. et al. L-Cysteine-modified gold nanostars for SERS-based copper ions detection in aqueous media. **Langmuir**, v. 30, p. 13491-13497, 2014.

OLIVEIRA, F. C. C. **Modelo de calibração multivariada associados à espectroscopia vibracional para análise de misturas diesel-óleos vegetais**. 2006. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

OTTO, A. Surface-Enhance Raman Scattering of Adsorbates. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 22, p. 743-752, 1991.

OTUBO, L. **Técnicas de caracterização de nanopartículas metálicas funcionalizadas**. Monografia (Qualificação de Doutorado em Química)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

PACHECO, L. H. **Estudo do potencial de aplicação de nanopartículas de ouro dispersas em material graxo para detecção de moléculas orgânicas via observação de efeito Raman Intensificado por Superfície (SERS)**. 2012. 83 p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

PAULI, G. E. N. et al. Lab-in-a-syringe using gold nanoparticles for rapid immunosensing of protein biomarkers. **Lab Chip.**, v. 15, p. 399-405, 2015.

PEREIRA, M. K. **Ressonância de plasmon de superfície localizado e espalhamento Raman em soluções coloidais de ouro**. 2009. 108 p. Dissertação (Mestrado em Física)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

POTAPKINA, E. V. et al. Investigation of pyridine–Ag(X), (X = NO₃⁻, ClO₄⁻) aqueous solutions: SERS and Raman study supported by NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 996, p. 128-134, 2011.

QIU, T. A. et al. Gene expression as an indicator of the molecular response and toxicity in the bacterium *Shewanella oneidensis* and the water flea *Daphnia magna* exposed to functionalized gold nanoparticles. **Environ. Sci.: Nano**, v. 2, p. 615-629, 2015.

RAIMUNDO JR, I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 83-88, 1997.

RAMAN Applications. **Diramed**. Disponível em: <http://www.diramed.com/raman_applications.html>. Acesso em: 14 mar. 2012.

RAMAN Spectroscopy Applications. **Renishaw**. Disponível em: <<http://www.renishaw.com/en/raman-spectroscopy-applications--6259>>. Acesso em: 14 out. 2016.

RAMAN spectroscopy basics. **Princeton Instruments**. Disponível em: <<http://www.princetoninstruments.com/spectroscopy/>>. Acesso em: 13 ago. 2016.

RAMAN: Application. **Chemistry LibreTexts**. 2014. Disponível em: <http://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy> Acesso em: 20 jul. 2016.

REINCKE, F. et al. Spontaneous assembly of a monolayer of charged gold nanocrystals at the water/oil interface. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 43, p. 458-462, 2004.

RESSONÂNCIA Plasmônica e as Cores das Nanopartículas. **Olhar Nano**. Disponível em: <<http://www.olharnano.com/>>. Acesso em: 15 out. 2016.

RIAUBA, L. et al. A study of cysteamine ionization in solution by Raman spectroscopy and theoretical modeling. **J. Phys. Chem. A**, v. 110, n. 50, p. 13394-13404, 2006.

ROHIT, J. V. et al. Development of p-nitroaniline dithiocarbamate capped gold nanoparticles-based microvolume UV–vis spectrometric method for facile and selective detection of quinalphos insecticide in environmental samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 237, p. 826-835, 2016.

SALA, O. et al. O laboratório de espectroscopia vibracional Hans Stammreich na Universidade de São Paulo. **Química Nova**, v. 7, n. 4, p. 320-326, out. 1984.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2 ed. São Paulo: UNESP, 2008.

SALA, O. **Memórias sobre o Laboratório de Espectroscopia Molecular**. São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.lem.iq.usp.br/novas-memorias-do-prof-sala-publicadas/>>. Acesso em: 22 set. 2016.

SANT'ANA, A. C.; CORIO, P.; TEMPERINI, M. L. A. O efeito SERS na análise de traços: o papel das superfícies nanoestruturadas. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 805-810, 2006.

SANTANA, H. et al. Preparação e caracterização de substratos sers ativos: um estudo da adsorção do Cristal violeta sobre nanopartículas de prata. **Química Nova**, v. 29, n.2, p. 194-199, 2006.

SHARMA, B. et al. SERS: Materials, applications, and the future. **Materials Today**, v. 15, n. 1-2, p. 16-25, 2012.

SHIOHARA, A.; WANG, Y.; LIZ-MARZÁN, L. Recent approaches toward creation of hot spots for SERS detection. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 21, p. 2-25, 2014.

SILVA, A. O. **Modificação eletroquímica da superfície de filmes finos de ouro SERS e SPR ativos**. 2011. 147 p. Tese (Doutorado em Física)- Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.

SILVA, E. C. et al. Synthesis of colloids based on gold nanoparticles dispersed in castor oil. **J. Nanopart. Res.**, v. 10, p. 201-208, 2008.

SINGH, R. C. V. Raman and the discovery of the Raman effect. **Phys. Perspect**, v. 4, p. 399-420, 2002.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. Thomson Learning, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2007.

SMITH, B. C. Low-frequency Raman spectra of amino acids measured with an astigmatism-free Schmidt-Czerny-Turner spectrograph: Discovery of a second fingerprint region. **Princeton Instruments – Application Note**. Rev. A6, 2013.

SONG, P. et al. Insight in layer-by-layer assembly of cysteamine and L-cysteine on the copper surface by electrochemistry and Raman spectroscopy. **Applied Surface Science**, v. 328, p. 86-94, 2015.

SOUZA, C. M. **Espectrofotometria Raman uma Contribuição da Física nas Perícias Forenses**, 2009. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/autores/jiraya07/>>. Acesso em: 11 out. 2016.

STILES, P. L. et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Annu. Rev. Anal. Chem.**, v. 1, p. 601-626, 2008.

SUN, D. et al. Biogenic flower-shaped Au–Pd nanoparticles: synthesis, SERS detection and catalysis towards benzyl alcohol oxidation. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, p. 1767-1773, 2014.

SUN, Y. et al. Highly sensitive Surface-Enhanced Raman Scattering substrate made from superaligned carbon nanotubes. **Nano Letters**, v. 10, n. 5, p. 1747-1743, 2010.

SURFACE Enhanced Raman Spectroscopy. **Wikipedia**. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Surface-enhanced-Raman-spectroscopy>>. Acesso em: 10 set. 2016.

Taça de 1.600 anos que muda de cor já usava princípios de nanotecnologia. G1, 2013. Disponível em: <[HTTP:// g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2013/08/ taca-de-1600-anos-que-muda-de-cor-ja-usava-principios-de-nanotecnologia/](http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2013/08/taca-de-1600-anos-que-muda-de-cor-ja-usava-principios-de-nanotecnologia/)>. Acesso em: 15 ago. 2016.

THIOPHENE. **Sigma-Aldrich**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/t31801?lang=pt®ion=BR>>. Acesso: 18 ago. 2016.

THIOPHENE. **Wikipedia**. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Thiophene#/media/File:Thiophene-CRC-MW-3D-balls-A.png>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

THIOPHENE. **Wikipedia**. Disponível em: <http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Thiophene_chemical_structure.png>. Acesso em: 18 ago. 2016.

TOMA, H. E. **O Mundo Nanométrico: A Dimensão do Novo Século**. 2. Ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2004.

TUNELAMENTO quântico. **Wikipedia**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Tunelamento_quântico>. Acesso em: 10 set. 2016.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discuss. Faraday Soc.**, v. 11, p. 55-75, 1951.

WANG, A. X.; KONG, X. Review of recent progress of plasmonic materials and nanostructures for Surface-Enhanced Raman Scattering. **Materials**, v. 8, p. 3024-3052, 2015.

WANG, D.; DUAN, H.; MÖHWALD, H. The water/oil interface: the emerging horizon for self-assembly of nanoparticles. **Soft Matter**, v. 1, p. 412-416, 2005.

WANG, M. et al. Nanoassemblies of colloidal gold nanoparticles by oxygen-induced inorganic ligand replacement. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9351-9356, 2010.

WANG, Y. et al. Facile fabrication of large area of aggregated gold nanorods film for efficient surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 318, p. 82-87, 2008.

WANG, Y. W.; KANG, S.; LIU, J. T. C. **Multiplexed molecular imaging with targeted SERS nanoparticles for rapid tumor detection**. In Biomedical Optics Congress, 2016, OSA, 2016.

WILLIAMS, L.; ADAMS, W. **Nanotechnology Demystified**. New York: McGraw-Hill, 2006.

XU, K. et al. Effect of gold nanoparticles on the performances of the phosphorescent organic light-emitting devices. **Current Applied Physics**, v. 14, p. 53-56, 2014.

XU, Y. et al. A method for promoting assembly of metallic and nonmetallic nanoparticles into interfacial monolayer films. **Nano Letters**, v. 16, p. 5255-5260, 2016.

YE, J. et al. Excitation wavelength dependent surface enhanced Raman scattering of 4-aminothiophenol on gold nanorings. **Nanoscale**, v. 4, p. 1606-1611, 2012.

YUAN, D. et al. An ECL sensor for dopamine using reduced graphene oxide/multiwall carbon nanotubes/gold nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 415-420, 2014.

ZHANG, L. et al. Hydrophilic Polymer Monolithic Capillary Microextraction Online Coupled to ICPMS for the Determination of Carboxyl Group-Containing Gold Nanoparticles in Environmental Waters. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 1789-1796, 2015.

ZHANG, P. et al. Nanoporous ionic organic networks: stabilizing and supporting gold nanoparticles for catalysis. **Nano Lett.**, v. 15, p. 823-828, 2015.

ZHOU, W. et al. Gold nanoparticles for *in vitro* diagnostics. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 10575-10636, 2015.

ZHU, G. et al. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, p. 1187-1195, 2011.